

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



EJU

REC'D	12 APR 1999
WIPO	PCT

ep 99/00696 **Bescheinigung**

Die MEDISCULAB ARZNEIMITTEL GMBH in Fellbach/Deutschland hat eine
Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Rekombinante Mistellektine"

am 3. Februar 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die Anmeldung ist auf die biosyn Arzneimittel GmbH in Fellbach/Deutschland
umgeschrieben worden.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüngli-
chen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol
C 07 K 14/415 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 18. Februar 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Keller

Aktenzeichen: 198 04 210.8

Rekombinante Mistellektine

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zum Herstellen von Mistellektin-Polypeptiden in homologen und heterologen Wirtssystemen sowie Mistellektin-Peptide als solche. Weiter werden Nukleinsäuremoleküle zur Verfügung gestellt, die für diese Mistellektin-Polypeptide kodieren, sowie pharmazeutische Zusammensetzungen, die diese Mistellektin-Polypeptide oder Mistellektin-Nukleinsäuren umfassen.

Die Mistel (*Viscum album*) ist seit dem Altertum als Heilpflanze bekannt. Die halbstrauchige Pflanze lebt als Halbparasit auf den Ästen von Holzgewächsen und ist vor allem in Europa, Nordaustralien, Asien und im tropischen und subtropischen Afrika weit verbreitet. Anfang dieses Jahrhunderts wurde die zyto- und tumortoxische Wirkung des Mistelextraktes erkannt, welches seitdem gezielt zur Krebstherapie eingesetzt wird. Dabei wird das Extrakt sowohl als Einzeltherapeutikum als auch in Kombination mit Chemo- oder Strahlentherapie eingesetzt. Besonders häufig werden Mistelpräparate z.B. nach chirurgischer Tumorentfernung als Rezidivprophylaktikum verwendet.

Systematische Untersuchungen der Wirkweise zeigten, daß wäßriges Mistelextrakt nach Injektion neben seiner zytotoxischen Wirkung ebenfalls immunmodulierend wirkt und außerdem allgemein stimmungsaufhellende Effekte zeigt. Nach Injektion von Mistelextrakt kann eine signifikante Steigerung der Zellzahlen bestimmter Lymphozytensubpopulationen (u.a. T-Helfer-Lymphozyten, natürliche Killerzellen(NK)-Zellen, Makrophagen) und der Phagozytoseaktivität bei Granulo- und Monozyten beobachtet werden, die unmittelbar an der Tumorabwehr beteiligt sind (Hajto, T., Hostanska, K., Gabius, H.-J. (1990), *Therapeutikum* 4, S. 135-145; Beuth, J., Ko, H.L., Tunggal, L., Gabius, H.-J., Steuer, M., Uhlenbruck, G., Pulverer, G. (1993), *Med. Welt* 44, S. 217-220; Beuth J., Ko, H.L., Tunggal, L., Geisel, J., Pulverer, G. (1993), *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 43 (I), S. 166-169; Beuth, J., Ko, H.L., Gabius, H.-J., Burrichter, H., Oette, Kl., Pulverer, G. (1992), *Clin. Investing*, 70, S. 658-661). Weiterhin kann eine signifikante Steigerung definierter Akutphaseproteine im Serum, welche durch die Zytokine IL-1, IL-6 und TNF- α vermittelt wird, nachgewiesen werden (Hajto, T., Hostanska, K., Frei, K., Rordorf, C., Gabius, H.-J. (1990), *Cancer Res.* 50, S. 3322-3326; Beuth, J.,

Ko, H.-L., Gabius, H.-J., Pulverer, G. (1991), *In Vivo* 5, 29-32; Beuth, J., Ko, H.-L., Tunggal, L., Jeljaszewicz, J., Steuer, M.K., Pulverer, G. (1994), *In Vivo* 8, (S. 989-992; Beuth, J., Ko, H.-L., Tunggal, L., Jeljaszewicz, J., Steuer, M.K., Pulverer, G. (1994), *Dtsch. Zschr. Onkol.* 26, S. 1-6; Beuth, J., Ko, H.-L., Tunggal, L., Steuer, M.K., Geisel, J., Jeljaszewicz, J., Pulverer, G. (1993), *In Vivo* 7, S. 407-410; Kayser, K., Gabius, S., Gabius, H.-J., Hagemeyer, O. (1992), *Tumordiag. und Ther.* 13, S. 190-195). Neben der durch Mistelextraktbehandlung erzielbaren Verlängerung der Überlebenszeit von Krebspatienten wird ebenfalls eine Steigerung der Lebensqualität der Patienten beobachtet, welche auf den Anstieg an β -Endorphinen im Blut zurückgeführt wird (Heiny, B.-M., Beuth, J. (1994), *Anticancer Res.* 14, S. 1339-1342; Heiny, B.-M., Beuth, J. (1994), *Dtsch. Zschr. Onkol.* 26, S. 103-108). β -Endorphine als körpereigene Opiode verbessern das allgemeine Wohlbefinden, indem sie z.B. schmerzlindernd wirken und den Angstindex verbessern (Falconer, J., Chan, E.C., Madsens, G. (1988), *J. Endocrinol.* 118, S. 5-8).

Die Analyse der Wirkstoffe des Mistelextraktes hat gezeigt, daß der immunstimulierende Effekt auf eine bestimmte Gruppe von Glykoproteinen, die Mistellektine, zurückzuführen ist. Bisher wurden drei mistelspezifische Lektine mit unterschiedlichen Molekulargewichten und Zuckerbindungsspezifitäten identifiziert. Die Konzentration des Mistellektins I (ML-I) im wäßrigen Pflanzenextrakt ist deutlich höher als die von Mistellektin II (ML-II) und Mistellektin III (ML-III). Es konnte gezeigt werden, daß der immunstimulierende Effekt des Mistelextrakts auf die Anwesenheit von ML-I zurückzuführen ist: wird das ML-I-Lektin aus dem Mistelextrakt entfernt, verliert das Extrakt seine immunstimulierende Wirkung (Beuth, J. Stoffel, B., Ko, H.-L., Jeljaszewicz, J., Pulverer, G. (1995), *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 45(II), S. 1240-1242). Das β -Galactosid-spezifische ML-I-Lektin besteht aus jeweils zwei glykosylierten A- und B-Ketten (MLA bzw. MLB), deren Molekulargewichte bei 29 kDa bzw. 34 kDa liegen. Die Aminosäuresequenz von MLA enthält eine potentielle Glykosylierungsstelle, während MLB drei Glykosylierungsstellen im N-terminalen Bereich der Aminosäuresequenz enthält. Die beiden Ketten sind durch eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft (Abbildung A; Ziska, P., Franz, H., Kindt, A. (1978), *Experientia* 34, S. 123-

124). Die resultierenden Mistellektin-Monomere können sich unter Ausbildung von nicht kovalenten Bindungen zu Dimeren zusammenlagern.

Die Untersuchungen des Sedimentationsverhaltens von ML-I während analytischer Zentrifugation zeigen, daß ML-I in vivo in einem Monomer-Dimer-Gleichgewicht vorliegt (Luther, P., Theise, H., Chatterjee, B., Karduck, D., Uhlenbruck, G. (1980), Int. J. Biochem. 11, S. 429-435). Die MLB-Kette ist in der Lage, an galactosehaltige Strukturen auf der Oberfläche von Zellmembranen (z.B. Rezeptormolekülen) zu binden und dadurch Zytokinfreisetzung auszulösen. Durch Endozytose gelangen ML-I-Dimere und -Monomere in die Zelle, wo durch Reduktion der Disulfidbrückenbindungen die Proteinkomplexe in MLA- und MLB-Ketten zerfallen. Die MLA-Ketten sind daraufhin in der Lage, an die ribosomale 28 S-Untereinheit zu binden und diese zu inaktivieren.

Die Untersuchung von ML-I-Monomeren mit Hilfe der 2-D-Gelelektrophorese ergab 25 verschiedene Isoformen, die auf unterschiedliche Kombinationen verschiedener A- und B-Ketten sowie unterschiedliche Glykosylierungszustände der Ketten zurückzuführen sind (Schink et al., 1992, Naturwissenschaften 79, S. 80 - 81). Es wird vermutet, daß die einzelnen Isoformen spezifische Funktionen erfüllen und jede dieser Isoformen zum anti-tumorigenen Effekt des Misteleextraktes beiträgt.

Bisher ist bereits aus der europäischen Patentanmeldung EP 0 751 211 A1 eine Nukleinsäuresequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz eines ML-I-Lektins bekannt. Dieses eine Polypeptid ist jedoch nicht in der Lage, die Wirkung der zahlreichen in natürlichem Misteleextrakt enthaltenen ML-I-Isoenzyme in bezug auf den anti-tumorigenen und stimmungsaufhellenden Effekt zufriedenstellend nachzuahmen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, das es erlaubt, Mistellektine in ausreichenden Mengen herzustellen und gleichzeitig die Diversität an ML-I-Isoenzymen des natürlichen Misteleextraktes nachzuempfinden.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch das Bereitstellen eines Verfahrens nach Anspruch 1 und/oder 40 gelöst.

Die vorliegende Erfindung stellt außerdem 2 neue Polypeptide der MLA-Kette und 6 neue Polypeptide der MLB-Kette von ML-I zur Verfügung, die einzeln oder in Kombination in einem geeigneten Wirtssystem exprimiert werden können. Dabei entstehen "homologe" und "heterologe" ML-I-Dimere, wobei der Begriff "homolog" ein Dimer bezeichnet, das aus jeweils zwei gleichen MLA- und MLB-Ketten besteht, und der Begriff "heterolog" ein Dimer beschreibt, das aus zwei verschiedenen MLA- und/oder zwei verschiedenen MLB-Ketten besteht. Die Diversität der MLA- und MLB-Ketten gestattet es, eine Vielzahl von verschiedenen MLA/MLB-Komplexen zu erzeugen, welche in ihrer therapeutischen Wirkung der oben beschriebenen Wirkung des Lektinmisches, das in wäßrigem Mistelextrakt nachgewiesen wurde, nachempfunden ist.

Einer der Vorteile, den die vorliegende Erfindung gegenüber der herkömmlichen Gewinnung von Mistelextrakten aus Frischpflanzen bietet, ist, daß die immunmodulierenden Komponenten des Mistelextraktes durch ein biotechnologisches Verfahren hergestellt werden können. Dies bedeutet, daß unabhängig vom pflanzlichen Rohmaterial, welches nur eingeschränkt zur Verfügung steht und nur zu einer bestimmten Zeit des Jahres geerntet werden kann, ausreichende Mengen an Mistellektin I produziert werden können. Darüberhinaus enthält ein auf diese Weise biotechnologisch hergestelltes Gemisch an Mistellektinen keine der in natürlichem Mistelextrakt auftretenden "Verunreinigungen", wie z.B. Viscotoxine.

Weiter wird es dadurch, daß die vorliegende Erfindung eine Vielzahl von unterschiedlichen MLA- und MLB-Polypeptiden von ML-I zur Verfügung stellt, möglich, zielgerichtet pharmakologische Zusammensetzungen zu "designen". Das bedeutet, daß z.B. durch die Auswahl bestimmter MLB-Polypeptide, die die Bindungsaffinität des MLA/MLB-Komplexes an die Zielzellen definieren, die immunmodulatorische Wirkung einer Zusammensetzung beeinflusst werden kann. Desweiteren kann durch

die Verwendung bestimmter MLA-Polypeptide die Zytotoxizität einer Zusammensetzung variiert werden.

Um das in Mistelextrakten enthaltene Gemisch an Mistellektinen biotechnologisch herstellen zu können, wurde zunächst die Aminosäuresequenz eines pharmakologisch interessanten Mistellektins aufgeklärt. Dazu wurde ein Mistelextrakt aus *Viscum album L. ssp. platyspermum* Kell, welche von Pappeln geerntet wurden, gewonnen und Mistellektin I durch Affinitätschromatographie partiell gereinigt (Beispiel 1). Die anschließende Analyse durch SDS-PAGE, HPLC und Sequenzanalyse durch Edman-Abbau ergab 2 MLA-Isoformen und 6 MLB-Isoformen.

Aus kurzen Bereichen der Aminosäuresequenzen wurden degenerierte Oligonukleotide abgeleitet, mit deren Hilfe die genomische Mistellektin-I-DNA-Sequenz unter Verwendung des PCR-Verfahrens ermittelt wurde. Überraschenderweise konnte trotz der zahlreichen identifizierten ML-I-Aminosäuresequenzen nur eine einzige dieser Sequenzen mehr oder weniger entsprechende Nukleinsäuresequenz identifiziert werden. Durch Southern-Blot-Analyse wurde bestätigt, daß das ML-I-Gen in lediglich einer Kopie pro Genom auftritt. Die Sequenzvariabilität der MLA- und MLB-Polypeptide ist daher lediglich durch das Auftreten von RNA-Editing oder anderen posttranskriptionalen oder posttranslationalen Modifikationen in Mistelzellen zu erklären.

Als "RNA-Editing" werden alle Prozesse bezeichnet, die zu Unterschieden zwischen der endgültigen mRNA-Sequenz und der entsprechenden "Template"-DNA führen, ausgenommen "RNA-Splicing" und tRNA-Modifikationen. Das "mRNA-Splicing" sowie das Auftreten von modifizierten tRNAs ist allgemein bekannt und wird daher hier nicht näher erläutert. Beim "RNA-Editing" werden co- oder posttranskriptional einzelne Nukleotide oder Stränge von bis zu mehreren 100 Nukleotiden Länge ausgetauscht, inseriert oder deletiert, was unter Umständen zu Leserasterveränderungen der kodierten Sequenz führen kann. Das erste Beispiel für RNA-Editing wurde bei Untersuchungen des *coxII*-Transkripts der mitochondrialen DNA von Trypanosomen entdeckt (Benne R. et al. (1986), Cell, 46, S. 819-826). Weiterhin wurde dieser Pro-

zeß in Mitochondrien und Chloroplasten von höheren Pflanzen sowie singulären nukleären Transkripten in Säugerzellen nachgewiesen. Der genaue Mechanismus des RNA-Editings ebenso wie die Mechanismen für posttranslationale Modifikationen der primären Aminosäuresequenz sind bisher jedoch erst sehr unvollständig in der Literatur beschrieben.

Da dieser Vorgang jedoch bisher nur in sehr wenigen Pflanzen nachgewiesen wurde und eine biotechnologische Herstellung der verschiedenen Mistellektin I-Polypeptide auch in anderen Pflanzenzellen außer Mistelzellen soweit wie möglich unabhängig von posttranskriptionalen oder posttranslationalen Veränderungen ermöglicht werden soll, wurde die genomische DNA durch gezielte Mutationen an die Sequenz der verschiedenen isolierten Polypeptide angepaßt. Weiterhin wurde die genomische Sequenz durch Mutationen an die bevorzugte Kodonbenutzung von *Brassica* angepaßt, um eine optimale Expression in z.B. Rapszellen zu ermöglichen.

Die vorliegende Erfindung stellt daher ein Verfahren zum Herstellen eines Mistellektin-Polypeptides oder eines Fragmentes davon im heterologen System mit der folgenden Sequenz zur Verfügung:

```

Y E R L R L R V T H Q T T G X1 E Y F R F I T L
L R D Y V S S G S F S N E I P L L R Q S T I P
V S D A Q R F V L V E L T N Q G X2 D S X3 T A A
I D V T N X4 Y V V A Y Q A G D Q S Y F L R D A
P R G A E T H L F T G T T R X5 S S L P F X6 G S
Y X7 D L E R Y A G H R D Q I P L G I X8 Q L I Q
S V X9 A L R X10 P G G S T R X11 Q A R S I L I L
I Q M I S E A A R F N P I L W R X12 R Q X13 I N
S G X14 S F L P D X15 Y M L E L E T S W G Q Q S

```

T Q V Q H S T D G V F N N P X16 R L A I X17 X18 G
 N F V T L X19 N V R X20 V I A S L A I M L F V C
 G E R P S S S D V R Y W P L V I R P V I A D D
 V T C S A S E P T V R I V G R X21 G M X22 V D V
 R D D D F H D G N Q I Q L W P S K S N N D P N
 Q L W T I K R D X23 T I R S N G S C L T T Y G Y
 T A G V Y V M I F D C N T A V R E A T I W Q I
 W X24 N G T I I N P R S N L V L A A S S G I K G
 T T L T V Q T L D Y T L G Q G W L A G N D T A
 P R E V T I Y G F R D L C M E S N X25 G S V W V
 E T C X26 S S Q X27 N Q X28 X29 W A L Y G D G S I R
 P K Q N Q D Q C L T X30 G R D S V S T V I N I V
 S C S X31 X32 S X33 X34 Q R W V F T N E X35 A I L N
 L K X36 X37 X38 X39 X40 D V A Q A N P K L R R I I I
 Y P A T G K P N Q M W L P V X41

umfassend den Schritt des Expressierens eines eukaryontischen oder prokaryontischen Vektors, in den eine nach dem üblichen genetischen Code für das Mistellektin-Polypeptid oder ein Fragment davon kodierende Nukleinsäure kloniert ist, in einem geeigneten heterologen eukaryontischen oder prokaryontischen Wirt,

wobei X1 D oder E ist; X2 G oder Q ist; X3 I oder V ist; X4 L oder A ist; X5 DR ist oder fehlt; X6 N oder T ist; X7 P oder T ist; X8 D oder E ist; X9 S oder T ist; X10 F oder Y ist; X11 T oder A ist; X12 A oder Y ist; X13 Y oder D ist; X14 A oder E ist; X15 V oder M ist; X16 I oder F ist; X17 P oder S ist; X18 P oder T ist; X19 T oder S ist; X20 D oder S ist; X21 N oder S ist; X22 C oder R ist; X23 G oder N ist; 24 G oder D ist; X25 G oder Q ist; X26 V oder D ist; X27 Q oder K ist; X28 G ist oder fehlt; X29 R oder K ist; X30 C oder S

14 05 03 99

oder V ist; X31 A oder G ist; X32 G oder A ist; X33 S oder G ist; X34 G oder S ist; X35 G oder Y ist; X36 N oder S oder T oder K ist; X37 S oder G ist; X38 L oder P ist; X39 A oder M ist; X40 M oder V ist; X41 P oder F ist.

Analog zu diesem Verfahren werden zwei weitere Herstellungsverfahren für die Mistellektin-A-Kette (MLA) und die Mistellektin-B-Kette (MLB) zur Verfügung gestellt, welche die folgenden Sequenzen oder ein Fragment davon umfassen:

Mistellektin-A:

Y E R L R L R V T H Q T T G X1 E Y F R F I T L

L R D Y V S S G S F S N E I P L L R Q S T I P

V S D A Q R F V L V E L T N Q G X2 D S X3 T A A

I D V T N X4 Y V V A Y Q A G D Q S Y F L R D A

P R G A E T H L F T G T T R X5 S S L P F X6 G S

Y X7 D L E R Y A G H R D Q I P L G I X8 Q L I Q

S V X9 A L R X10 P G G S T R X11 Q A R S I L I L

I Q M I S E A A R F N P I L W R X12 R Q X13 I N

S G X14 S F L P D X15 Y M L E L E T S W G Q Q S

T Q V Q H S T D G V F N N P X16 R L A I X17 X18 G

N F V T L X19 N V R X20 V I A S L A I M L F V C

G E R P S S S

14 05 03 99

Mistellektin-B:

D D V T C S A S E P T V R I V G R X21 G M X22 V D
V R D D D F H D G N Q I Q L W P S K S N N D P N
Q L W T I K R D X23 T I R S N G S C L T T Y G Y
T A G V Y V M I F D C N T A V R E A T I W Q I W
X24 N G T I I N P R S N L V L A A S S G I K G T T
L T V Q T L D Y T L G Q G W L A G N D T A P R E
V T I Y G F R D L C M E S N X25 G S V W V E T C
X26 S S Q X27 N Q X28 X29 W A L Y G D G S I R P K Q N
Q D Q C L T X30 G R D S V S T V I N I V S C S X31
X32 S X33 X34 Q R W V F T N E X35 A I L N L K X36 X37
X38 X39 X40 D V A Q A N P K L R R I I I Y P A T G
K P N Q M W L P V X41

wobei X1 bis X41 die oben angegebene Bedeutung haben.

Des weiteren wird ein Mistellektin-Polypeptid oder ein Fragment davon, das die Sequenzvariabilität der verschiedenen MLA- und MLB-Ketten umfaßt, mit der folgenden Sequenz zur Verfügung gestellt:

Y E R L R L R V T H Q T T G X1 E Y F R F I T L
L R D Y V S S G S F S N E I P L L R Q S T I P
V S D A Q R F V L V E L T N Q G X2 D S X3 T A A

10 050000

I D V T N X4 Y V V A Y Q A G D Q S Y F L R D A

P R G A E T H L F T G T T R X5 S S L P F X6 G S

Y X7 D L E R Y A G H R D Q I P L G I X8 Q L I Q

S V X9 A L R X10 P G G S T R X11 Q A R S I L I L

I Q M I S E A A R F N P I L W R X12 R Q X13 I N

S G X14 S F L P D X15 Y M L E L E T S W G Q Q S

T Q V Q H S T D G V F N N P X16 R L A I X17 X18 G

N F V T L X19 N V R X20 V I A S L A I M L F V C

G E R P S S S D V R Y W P L V I R P V I A D D

V T C S A S E P T V R I V G R X21 G M X22 V D V

R D D D F H D G N Q I Q L W P S K S N N D P N

Q L W T I K R D X23 T I R S N G S C L T T Y G Y

T A G V Y V M I F D C N T A V R E A T I W Q I

W X24 N G T I I N P R S N L V L A A S S G I K G

T T L T V Q T L D Y T L G Q G W L A G N D T A

P R E V T I Y G F R D L C M E S N X25 G S V W V

E T C X26 S S Q X27 N Q X28 X29 W A L Y G D G S I R

P K Q N Q D Q C L T X30 G R D S V S T V I N I V

S C S X31 X32 S X33 X34 Q R W V F T N E X35 A I L N

11 05 03 99

L K X36 X37 X38 X39 X40 D V A Q A N P K L R R I I I
Y P A T G K P N Q M W L P V X41

Außerdem werden Mistellektin-Polypeptide der Mistellektin-A-Kette und Mistellektin-B-Kette oder Fragmente dieser Sequenzen bereitgestellt, die die folgenden Sequenzen umschließen.

Mistellektin-A:

Y E R L R L R V T H Q T T G X1 E Y F R F I T L
L R D Y V S S G S F S N E I P L L R Q S T I P
V S D A Q R F V L V E L T N Q G X2 D S X3 T A A
I D V T N X4 Y V V A Y Q A G D Q S Y F L R D A
P R G A E T H L F T G T T R X5 S S L P F X6 G S
Y X7 D L E R Y A G H R D Q I P L G I X8 Q L I Q
S V X9 A L R X10 P G G S T R X11 Q A R S I L I L
I Q M I S E A A R F N P I L W R X12 R Q X13 I N
S G X14 S F L P D X15 Y M L E L E T S W G Q Q S
T Q V Q H S T D G V F N N P X16 R L A I X17 X18 G

N F V T L X19 N V R X20 V I A S L A I M L F V C

G E R P S S S

Mistellektin-B:

D D V T C S A S E P T V R I V G R X21 G M X22 V D
V R D D D F H D G N Q I Q L W P S K S N N D P N
Q L W T I K R D X23 T I R S N G S C L T T Y G Y
T A G V Y V M I F D C N T A V R E A T I W Q I W
X24 N G T I I N P R S N L V L A A S S G I K G T T
L T V Q T L D Y T L G Q G W L A G N D T A P R E
V T I V G F R D L C M E S N X25 G S V W V E T C

X26 S S Q X27 N Q X28 X29 W A L Y G D G S I R P K Q N
Q D Q C L T X30 G R D S V S T V I N I V S C S X31
X32 S X33 X34 Q R W V F T N E X35 A I L N L K X36 X37
X38 X39 X40 D V A Q A N P K L R R I I I Y P A T G
K P N Q M W L P V X41

wobei X1 bis X41 die oben angegebene Bedeutung haben.

Die Sequenz, die die oben beschriebene Variabilität der in Mistelzellen auftretenden ML-I-Polypeptide umfaßt, ist in Abbildung 1b dargestellt. Eine spezifische Sequenz für MLA2 des Mistellektins I, welche ebenfalls nach dem oben dargestellten Verfahren hergestellt wurde, ist in Abbildung 3b dargestellt. Die Abbildungen 7b bis 12b umfassen

spezifische Mistellektin-B-Kettensequenzen, die ebenfalls nach dem oben beschriebenen Verfahren hergestellt wurden.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zum Bereitstellen eines Nukleinsäuremoleküls, das in einem heterologen Wirt für ein Mistellektin-Polypeptid wie oben beschrieben kodiert und die folgenden Schritte umfaßt:

- a) Präparieren von Mistelzell-RNA oder chromosomaler Mistelzell-DNA und
- b) Amplifizieren von Mistelzell-RNA oder chromosomaler Mistellektin-DNA durch PCR unter Verwendung von Oligonukleotiden, die von dem in Abb.1b dargestellten Mistellektin-Polypeptid abgeleitet sind, und
- c) gegebenenfalls Identifizieren von Sequenzen, die 5' und 3' von der amplifizierten Nukleinsäure liegen sowie deren Amplifikation, und
- d) Isolieren der in Schritt b) und/oder c) amplifizierten Nukleinsäuremoleküle, und
- e) gegebenenfalls Ligieren mehrerer der in Schritt b) und/oder c) amplifizierten Nukleinsäuremoleküle, so daß ein Nukleinsäuremolekül mit vollständigem offenen Leseraster erhalten wird und
- f) gezieltes Mutieren des erhaltenen Nukleinsäuremoleküls um das Nukleinsäuremolekül dem üblichen genetischen Code des heterologen Wirtes für eine der in Mistelzellen identifizierten Mistellektin-Polypeptidisoformen anzupassen.

Zur Präparation von Mistelzell-DNA wurden Mistelpflanzen (*Viscum album L. ssp. platyspermum* Kell), die von Pappeln aus dem Elsaß geerntet wurden, in flüssigem Stickstoff zerstoßen und die chromosomale DNA extrahiert (Beispiel 1). Unter Verwendung der unten dargestellten, degenerierten Oligonukleotide wurden mit Hilfe des PCR-Verfahrens Fragmente der genomischen Mistellektin-DNA amplifiziert (Beispiel 2). Die in der PCR-Reaktion eingesetzten degenerierten Oligonukleotide, die an Bereiche der MLB-Ketten-DNA hybridisieren, haben die Sequenz:

(BI):

GTN MGN GAY GAY GAY TTY CA

(BII):

AT YTG RTT NGG YTT NCC NGT

Die Abkürzungen der Nukleotide richten sich dabei nach der von der IUPAC-IUB Biochemischen Nomenklatur-Kommission vorgeschlagenen Bezeichnung.

In einem weiteren Reaktionsschritt wurden unter Verwendung von spezifischen Oligonukleotiden mit Hilfe der RACE-Technik die 5'- und 3'-liegenden Sequenzen des ersten Amplifikationsproduktes ermittelt (Beispiel 3). Das für die 5'-RACE-Reaktion benutzte Oligonukleotid hat die folgende Sequenz:

CAC AGC AGT ATT ACA GTC GAA

Das für die 3'-RACE-Reaktion benutzte Oligonukleotid hat die folgende Sequenz:

GTC TAT GTG ATG ATC TTC GAC TGT

Die so erhaltene vollständige Nukleinsäuresequenz wurde zur Synthese spezifischer Oligonukleotide benutzt, um mittels PCR einen Gesamtklon zu bekommen. Alternativ wurden die teilweise überlappenden Klone unter Verwendung von geeigneten Restriktionsschnittstellen gespalten, um in einem geeigneten Vektor zusammengesetzt zu werden, so daß ein vollständiges offenes Leseraster des Mistellektin I-Gens erhalten wurde. In diese DNA-Konstrukte können durch bekannte Techniken gezielt Mutationen eingeführt werden, z.B. durch Ersetzen bestimmter DNA-Bereiche durch andere DNA-Fragmente, Einfügen von nicht vollständig homologen Oligonukleotiden, etc. Diese Mutationen können dazu dienen, einerseits die davon abgeleitete Aminosäuresequenz zu verändern und so die Aktivität des Polypeptides zu beeinflussen oder andererseits die Nukleinsäuresequenz zu variieren,

ohne die Aminosäuresequenz zu verändern, um z.B. den bevorzugten Kodongebrauch eines Wirtsorganismus nachzuempfinden.

Nukleinsäuremoleküle, die durch dieses Verfahren zur Verfügung gestellt werden und für ein Polypeptid, wie oben beschrieben, kodieren, umfassen die folgenden Sequenzen für ML-I, MLA und MLB oder Fragmente davon:

1) ML-I-Sequenz:

TACGAGAGGCTAAGACTCAGAGTTACGCATCAAACCACGGGCGAKGAATACTTCCGGTTCATCAG
 CTTCTCCGAGATTATGTCTCAAGCGGAAGCTTTTCCAATGAGATACCACTCTTGCGTCAGTCTACG
 ATCCCCGTCTCCGATGCGCAAAGATTGTCTTGGTGGAGCTACCAACCAGGGGSRGACTCGRTY
 ACGGCCGCCATCGACGTTACCAATSYKTACGTCGTGGCTTACCAAGCAGGCGACCAATCCTACTTT
 TTGCGCGACGCACCACGCGGCGCGGAAACGCACCTCTTACCAGGCACCACCCGAZ1TCCTCTCTCC
 CATTCAMYGGAAGCTACMCYGATCTGGAGCGATACGCCGGACATAGGGACCAGATCCCTCTCGGTA
 TAGASCAACTCATTCAATCCGTCWCKGCGCTTCGTTWYCCGGGCGGCAGCAGCGGTRCYAAGCTC
 GTTCGATTTTAATCCTCATTGATGATCTCCGAGGCCGCCAGATTCAATCCCATCTTATGGAGGK
 MYCGCCAAKAYATTAACAGTGGGGMRTCATTTCTGCCAGACRTGTACATGCTGGAGCTGGAGACGA
 GTTGGGGCCAACAATCCACGCAAGTCCAGCATTCAACCGATGGCGTTTTTAATAACCCAWTYCGGT
 TGGCTATAYCYMCYGGTAACTTCGTGACGTTGWCYAATGTTGCKMYGTGATCGCCAGCTTGGCGA
 TCATGTTGTTTGTATGCGGAGAGCGGCCATCTTCCTCTGACGTGCGCTATTGGCCGCTGGTCATAC

GACCCGTGATAGCCGATGATGTTACCTGCAGTGCTTCGGAACCTACGGTGCGGATTGTGGGTCGAA
RTGGCATGYGCGTGGACGTCCGAGATGACGATTTCACGATGGGAATCAGATACAGTTGTGGCCCT
CCAAGTCCAACAATGATCCGAATCAGTTGTGGACGATCAAAGGGATRRMACCATTCGATCCAATG
GCAGCTGCTTGACCACGTATGGCTATACTGCTGGCGTCTATGTGATGATCTTCGACTGTAATACTG
CTGTGCGGGAGGCCACTATTTGGCAGATATGGGRCAATGGGACCATCATCAATCCAAGATCCAATC
TGGTTTTGGCAGCATCATCTGGAATCAAAGGCACTACGCTTACGGTGCAAACACTGGATTACACGT
TGGGACAGGGCTGGCTTGCCGGTAATGATACCGCCCCACGCGAGGTGACCATATATGGTTTCAGGG
ACCTTTGCATGGAATCAAATSRAGGGAGTGTGTGGGTGGAGACGTGCGWSAGTAGCCAAMAGAACC
AAZ2ARATGGGCTTTGTACGGGGATGGTTCTATACGCCCCAAACAAAACCAAGACCAATGCCTCAC

CKBTGGGAGAGACTCCGTTTCAACAGTAATCAATATAGTTAGCTGCAGCGSWGSWTCGKSKKSKCA
GCGATGGGTGTTTACCAATGAAKRSGCCATTTTGAATTTAAAGAVWRGSYYGRYSRTGGATGTGGC
GCAAGCAAATCCAAAGCTCCGCCGAATAATTATCTATCCTGCCACAGGAAAACCAAATCAAATGTG
GCTTCCCGTGYYMTGA

II) MLA-Sequenz:

TACGAGAGGCTAAGACTCAGAGTTACGCATCAAACCACGGGCGAKGAATACTTCCGGTTCATCACG
CTTCTCCGAGATTATGTCTCAAGCGGAAGCTTTTCCAATGAGATACCACTCTTGCGTCAGTCTACG

17 05 03 99

ATCCCCGTCTCCGATGCGCAAAGATTGTCTTGGTGGAGCTCACCAACCAGGGGSRRGACTCGRTY
ACGGCCGCCATCGACGTTACCAATSYKTACGTCGTGGCTTACCAAGCAGGCGACCAATCCTACTTT
TTGCGCGACGCACCACGCGGCGCGGAAACGCACCTCTTCACCGGCACCACCCGAZ1TCCTCTCTCC
CATTCAMYGGAAGCTACMCYGATCTGGAGCGATACGCCGGACATAGGGACCAGATCCCTCTCGGTA
TAGASCAACTCATTCAATCCGTCWCKGCGCTTCGTTWYCCGGGCGGCAGCACGCGTRCYCAAGCTC
GTTTCGATTTTAATCCTCATTAGATGATCTCCGAGGCCGCCAGATTCAATCCCATCTTATGGAGGK
MYCGCCAAKAYATTAACAGTGGGGMRTCATTTCTGCCAGACRTGTACATGCTGGAGCTGGAGACGA
GTTGGGGCCAACAATCCACGCAAGTCCAGCATTCAACCGATGGCGTTTTTAATAACCCAWTYCGGT
TGGCTATAYCYMCYGGTAACTTCGTGACGTTGWCYAATGTTGCKMYGTGATCGCCAGCTTGGCGA
TCATGTTGTTTGTATGCGGAGAGCGGCCATCTTCCTCT

III) MLB-Sequenz:

GATGATGTTACCTGCAGTGCTTCGGAACCTACGGTGCGGATTGTGGGTCTGAARTGGCATGYGCGTG
GACGTCCGAGATGACGATTTCCACGATGGGAATCAGATACAGTTGTGGCCCTCCAAGTCCAACAAT
GATCCGAATCAGTTGTGGACGATCAAAAGGGATRRMACCATTCGATCCAATGGCAGCTGCTTGACC
ACGTATGGCTATACTGCTGGCGTCTATGTGATGATCTTCGACTGTAATACTGCTGTGCGGGAGGCC
ACTATTTGGCAGATATGGGRCAATGGGACCATCATCAATCCAAGATCCAATCTGGTTTTTGGCAGCA
TCATCTGGAATCAAAGGCACTACGCTTACGGTGCAAACACTGGATTACACGTTGGGACAGGGCTGG

14 05 03 99

CTTGCCGGTAATGATACCGCCCCACGCGAGGTGACCATATATGGTTTCAGGGACCTTTGCATGGAA
TCAAATSRAGGGAGTGTGTGGGTGGAGACGTGCGWSAGTAGCCAAMAGAACCAAZ2ARATGGGCTT
TGTACGGGGATGGTTCTATACGCCCCAAACAAAACCAAGACCAATGCCTCACCKBTGGGAGAGACT
CCGTTTCAACAGTAATCAATATAGTTAGCTGCAGCGSWGSWTCGKSKKSKCAGCGATGGGTGTTTA
CCAATGAAKRSGCCATTTTGAATTTAAAGAVWRGSYYGRYSRTGGATGTGGCGCAAGCAAATCCAA
AGCTCCGCCGAATAATTATCTATCCTGCCACAGGAAAACCAAATCAAATGTGGCTTCCCGTGYYMT
GA

Die Nukleotide sind gemäß dem IUPAC-IUB Code definiert; Z₁ bezeichnet die Nukleotidsequenz GAT AGA oder fehlt, während Z₂ die Nukleotidsequenz GGC bezeichnet oder fehlt.

Ein spezifisches Nukleinsäuremolekül, das nach dem oben angegebenen Verfahren dargestellt wurde und die gesamte ML-I kodierende Sequenz umfaßt, ist in der Abbildung 1a gezeigt. Weitere spezifische Nukleinsäuremoleküle, die für die MLA-Kette von Mistellektin I kodieren und nach dem oben angegebenen Verfahren dargestellt wurden, werden in Abbildung 2a und Abbildung 3a gezeigt. In Abbildungen 7a bis 12a sind spezifische Sequenzen für MLB-Nukleinsäuremoleküle, die nach dem oben beschriebenen Verfahren dargestellt wurden, aufgeführt. Dabei kodiert jede dieser Nukleinsäuresequenzen für ein Polypeptid, das durch Proteinsequenzierung des ML-I-Gemisches aus natürlichem Mistelextrakt hervorgegangen ist.

Die vorliegende Erfindung umfaßt außerdem Nukleinsäuremoleküle, die für ein Mistellektin-Polypeptid, wie oben beschrieben, kodieren und dadurch gekennzeichnet sind, daß der Kodongebrauch an die Bedürfnisse eines heterologen Wirts angepaßt ist. In Abbildung 4a ist eine solche Nukleinsäuresequenz dargestellt, wobei der Kodongebrauch an die bevorzugte Kodonverwendung der Gattung *Brassica* angepaßt ist. Diese

Gattung wurde ausgewählt, da sie sowohl als Sommer- als auch als Winterform in den mittleren Breiten Europas, Nordamerikas und Asiens hervorragend gedeiht. Die Einsatzmöglichkeiten für Raps zur Produktion von rekombinanten Proteinen konnte von verschiedenen Firmen und Forschungsinstituten gezeigt werden. Anwendungsbeispiele sind die Produktion von gastrischer Lipase zum Einsatz in der Mukoviszidose-Behandlung oder die Kopplung an Oleosine zur erleichterten Aufreinigung der rekombinanten Proteine aus der Lipidphase der Rapsölsamen.

Die in Abbildungen 5a, 6a und 13a bis 18a dargestellten Sequenzen repräsentieren Nukleinsäuremoleküle, die für MLA-Polypeptide bzw. für MLB-Polypeptide des Mistel-
lektins I kodieren und ebenfalls in ihrer Kodonverwendung an die Gattung *Brassica* angepaßt sind. Der Homologiegrad zwischen diesen angepaßten Sequenzen zu den in Abb. 2a und 7a dargestellten Nukleinsäuresequenzen beträgt für MLA ca. 61% und für MLB ungefähr 63%.

Durch die vorliegende Erfindung wird weiterhin ein Vektor zur Verfügung gestellt, der eines der oben beschriebenen Nukleinsäuremoleküle oder ein Fragment davon sowie einen die Expression dieses Nukleinsäuremoleküls regulierenden Promotor umfaßt. In einer bevorzugten Ausführungsform enthält dieser Vektor in funktioneller Verbindung mit den oben beschriebenen Nukleinsäuremolekülen einen Promotor, der nur in der vorgesehenen Wirtszelle aktiviert werden kann. Die Wirtszelle kann dabei eine pflanzliche oder eine tierische Zelle sein. Wirtszellspezifische Promotoren werden bereits, teilweise zusammen mit zelltypspezifischen, regulierbaren Enhancersequenzen, zur selektiven Expression von therapeutischen Genen eingesetzt (Walter W. und Stein U., *Molecular Biotechnology*, 1996, 6 (3), S. 267-86). Es wurden ebenfalls Systeme entwickelt, in denen Induktoren und Repressoren auf einen gentechnisch modifizierten Transkriptionsfaktor wirken, der spezifisch einen ebenfalls modifizierten Promotor erkennt. Dies erlaubt die regulierte Expression von z.B. therapeutischen Proteinen, ohne dabei zelluläre Promotoren unspezifisch zu aktivieren (Miller N. und Whelan J., *Human Gene Therapy*, 1997, 8(7), S. 803-815).

Ein bevorzugter Vektor ist ein RNA-Vektor, wie z.B. in Kumagai et al. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1993, 90, S. 427-430, beschrieben. Dieses System bietet im Vergleich zu

anderen Pflanzenexpressionssystemen die Vorteile, daß erstens hohe Ausbeuten an rekombinanten Proteinen erzielt werden können und zweitens eine wesentlich schnellere Etablierung des Verfahrens stattfindet, da nur der RNA-Vektor genetisch verändert wird und die Pflanze nach Infektion die Produktion des rekombinanten Proteins aufnimmt.

Wirtssysteme, die zur heterologen Expression der oben beschriebenen Nukleinsäuren dienen sollen, können aus der Bakterienzellen, Pflanzenzellen mit der Ausnahme von Mistelzellen; Insektenzellen; Insektenlarven; Vertebratenzellen, bevorzugt Säugerzellen; Hefezellen; Pilzzellen; transgene Vertebraten mit Ausnahme des Menschen und/oder transgene Pflanzen mit der Ausnahme von Mistelpflanzen umfassenden Gruppe ausgewählt sein. Dabei werden bevorzugterweise *Escherichia coli* als Bakterienzellen, Rapszellen als Pflanzenzellen, *Trichoplusia ni* als Insektenlarven, *Spodoptera frugiperda*-Zellen als Insektenzellen und Zebrafische als Vertebraten verwendet.

Die vorliegende Erfindung umfaßt pharmazeutische Zusammensetzungen, die mindestens eines der oben erwähnten Nukleinsäuremoleküle oder einen der oben beschriebenen Vektoren enthalten.

Eine bevorzugte pharmazeutische Zusammensetzung enthält zusätzlich Liposomen, die die linearen Nukleinsäuremoleküle bzw. die Vektoren einschließen, um sie gegen nukleolytischen Abbau zu schützen. Dabei können diese Liposomen auf ihrer Oberfläche Zellerkennungsmoleküle tragen, die eine selektive Anlagerung an spezifische Zielzellen ermöglichen. Solche oberflächenmodifizierten Liposomen der sogenannten "zweiten Generation" (z.B. Immunliposomen und "long-circulating liposomes") werden bereits zur gezielten Transfektion spezifischer Zelltypen von Krebspatienten erfolgreich eingesetzt (Storm G. und Crommelin D.J., *Hybridoma*, 1997, 16 (1), S. 119-125; Thierry A.R. et al., *Gene Therapy*, 1997, 4 (3), S. 226-237).

Eine weitere pharmazeutische Zusammensetzung ist vorgesehen, bei der das lineare Nukleinsäuremolekül bzw. der Vektor direkt oder über ein Linkersystem (z.B. Biotin-Streptavidin-Kopplung) an eines der oben beschriebenen MLB-Polypeptide gekoppelt wird. Die MLB-Polypeptideinheit vermittelt dabei die Anlagerung des Komplexes an zuk-



kerhaltige Strukturen auf der Zellmembran und induziert die endozytotische Aufnahme des Komplexes. Auf diese Weise kann z.B. eine für das zytotoxische MLA kodierende Nukleinsäure gerichtet in eine Zelle transportiert werden, wo sie anschließend in ein Protein translatiert wird und dann die zelleigenen Ribosomen inaktiviert. Zusätzlich kann ein solcher Komplex Peptide wie z.B. Antikörper, Antikörperfragmente oder rezeptorbindende Peptide (Liganden) enthalten, die in der Lage sind, zellspezifische Bindungen durchzuführen.

Eine weitere bevorzugte pharmakologische Zusammensetzung umfaßt neben dem linearen Nukleinsäuremolekül oder dem Vektor einen Viruspartikel. In diesem Fall ist ein Virus-Vektor bevorzugt. Der Viruspartikel kann dabei auf seiner Oberfläche ebenfalls Zellerkennungsmoleküle zur spezifischen Zellerkennung tragen. Diese Moleküle können z.B. Fusionsproteine von viralen Proteinen mit zellspezifisch bindenden Polypeptiden sein. Durch Präsentation dieser Peptide auf der Oberfläche des Viruspartikels kann eine gezielte Anlagerung dieser Partikel erreicht werden (Joelson T. et al., Journal of General Virology, 1997, 78 (6), S. 1213-1217; Grabherr R. et al., Biotechnics, 1997, 22 (4), S. 730-735).

Die vorliegende Erfindung umfaßt weiterhin eine pharmazeutische Zusammensetzung, die mindestens eines der oben beschriebenen Mistellektin-Polypeptide und/oder mindestens ein Fragment derselben als zytotoxische Komponente enthält. Die pharmazeutische Effizienz einer solchen Zusammensetzung kann wiederum durch Kopplung der Polypeptide oder Polypeptid-Fragmente mit Zellerkennungsmolekülen, die selektiv an Zielzellen binden, erhöht werden. In einer bevorzugten Ausführungsform der pharmazeutischen Zusammensetzung ist das Zellerkennungsmolekül ein Antikörpermolekül, ein Antikörper-Fragment oder jedes andere Protein- und Peptidmolekül, welches die Fähigkeit besitzt, spezifisch an die Zielzellen zu binden, z.B. ein Peptidhormon oder ein Fragment dieses Hormons wie das "gonadotropin-releasing hormone" und solche Fragmente, die spezifisch an Rezeptoren von Adenokarzinomzellen binden oder Peptide, die bei einer speziellen Leukämie-Form an den Interleukin-2-Wachstumsfaktor Rezeptor der Lymphomzellen ("cutaneous T cell lymphoma") binden. Auch Nicht-Protein-Moleküle, die sich in Zielzellen anreichern bzw. an sie binden, wie cis-Platin oder Häm und dessen Vorstufen, können geeignete Zellerkennungsmoleküle für die Kopplung an die zytotoxische Komponente des ML-I sein. Dadurch, daß die zytotoxische Komponente gezielt

ins Zellinnere der entarteten Zellen gelangt, können die Dosis an Toxin relativ gering gehalten werden und Nebenwirkungen auf gesundes Gewebe minimiert werden.

Dabei können diese Zielerkennungsmoleküle durch bekannte chemische Verfahren an die Mistellektin-Polypeptide gekoppelt werden. Des weiteren ist es möglich, Fusionsproteine aus oben beschriebenen Polypeptiden und einem geeigneten Antikörper bzw. einem Fragment davon in einem der ebenfalls oben beschriebenen Wirtssysteme zu erzeugen. Als Fusionsproteine eignen sich z.B. auch rekombinante Proteine, die aus einem hier beschriebenen Polypeptid und einer IL-2 Rezeptor-bindenden "homing"-Komponente oder einem gentechnisch modifizierten Fragment des Gonadotropin-Releasing-Faktors bestehen.

Eine erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung umfaßt mindestens eines der oben beschriebenen Polypeptide und/oder ein Fragment davon, in der Regel zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger. Dabei läßt sich den Bedürfnissen des Patienten entsprechend eine bestimmte Mischung verschiedener MLA- und/oder MLB-Polypeptide zusammenstellen. Um die Diversität der Mistellektin-I-Isoenzyme des natürlichen Mistelextraktes nachzuempfinden, enthält eine zytotoxische Zusammensetzung bevorzugt mehrere bzw. alle der oben angegebenen MLA/MLB-Polypeptide. Der pharmazeutisch verträgliche Träger kann ein Puffer, ein Verdünnungsmittel, ein Füllstoff, Lösungsmittel, Gleitmittel, Geschmacksstoff, Bindungsmittel, Konservierungsmittel und/oder einschließendes Material sein. Die pharmazeutische Zusammensetzung wird so formuliert, daß sie sowohl zur oralen als auch parenteralen Verabreichung, insbesondere der subkutanen, intramuskulären und intravenösen Verabreichung geeignet ist. Bei bestimmten Erkrankungen können auch inhalative, rektale, vaginale und kutane Darreichungsformen zur Anwendung kommen.

Ein oben erwähntes erfindungsgemäßes Mistellektin-Polypeptid oder ein Fragment davon kann aufgrund einer anti-tumorigenen Wirkung zur Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung von unkontrolliertem Zellwachstum, z.B. von Krebs eingesetzt werden. Des weiteren kann ein solches Mistellektin-Polypeptid oder ein Fragment davon, dessen zytotoxische Aktivität, z.B. durch Veränderungen am aktiven Zentrum (Aminosäuren Y₇₆, Y₁₁₅, E₁₆₅, R₁₆₈, W₁₉₉) blockiert wurde, in Verbindung mit mindestens einem weiteren An-

tigen zur Herstellung eines Medikamentes dienen, welches die Immunreaktion gegen das weitere Antigen zu stärken vermag. Aus z.B. dem europäischen Patent 0 320 528 sind bereits Proteine bekannt (Hämocyanine und Arylphorine), die eine stark antigene Reaktion hervorrufen können. Ähnlich wie diese Substanzen können auch die erfindungsgemäßen Mistellektine eine Aktivierung von T-Lymphozyten und Lymphokinproduzierenden Makrophagen auslösen und dadurch die körpereigene Abwehr stärken.

Weiterhin umfaßt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Herstellen eines Mistellektin-Polypeptides in Mistelzellen und/oder einer transgenen Mistelpflanze mit der folgenden Sequenz:

```

Y E R L R L R V T H Q T T G X1 E Y F R F I T L
L R D Y V S S G S F S N E I P L L R Q S T I P
V S D A Q R F V L V E L T N Q G X2 D S X3 T A A
I D V T N X4 Y V V A Y Q A G D Q S Y F L R D A
P R G A E T H L F T G T T R X5 S S L P F X6 G S
Y X7 D L E R Y A G H R D Q I P L G I X8 Q L I Q
S V X9 A L R X10 P G G S T R X11 Q A R S I L I L
I Q M I S E A A R F N P I L W R X12 R Q X13 I N
S G X14 S F L P D X15 Y M L E L E T S W G Q Q S
T Q V Q H S T D G V F N N P X16 R L A I X17 X18 G
N F V T L X19 N V R X20 V I A S L A I M L F V C
G E R P S S S D V R Y W P L V I R P V I A D D
V T C S A S E P T V R I V G R X21 G M X22 V D V

```


R D D D F H D G N Q I Q L W P S K S N N D P N
 Q L W T I K R D X23 T I R S N G S C L T T Y G Y
 T A G V Y V M I F D C N T A V R E A T I W Q I
 W X24 N G T I I N P R S N L V L A A S S G I K G
 T T L T V Q T L D Y T L G Q G W L A G N D T A
 P R E V T I Y G F R D L C M E S N X25 G S V W V
 E T C X26 S S Q X27 N Q X28 X29 W A L Y G D G S I R
 P K Q N Q D Q C L T X30 G R D S V S T V I N I V
 S C S X31 X32 S X33 X34 Q R W V F T N E X35 A I L N
 L K X36 X37 X38 X39 X40 D V A Q A N P K L R R I I I
 Y P A T G K P N Q M W L P V X41

umfassend den Schritt des Expressierens eines eukaryontischen Vektors, der eine für das Mistellektin-Polypeptid oder ein Fragment davon kodierende Nukleinsäure mit der ursprünglich in Mistelzell-DNA gefundenen Nukleinsäuresequenz enthält, in einer Mistelzelle oder einer transgenen Mistelpflanze, wobei das Transkriptionsprodukt dieses Nukleinsäuremoleküls in Mistelzellen oder transgenen Mistelpflanzen durch RNA-Editing und weitere normalerweise vorkommende posttranskriptionale und/oder posttranslationale Mechanismen modifiziert wird und damit gegebenenfalls zur Herstellung des natürlichen Mistellekingemisches führt,

wobei X1 D oder E ist; X2 G oder Q ist; X3 I oder V ist; X4 L oder A ist; X5 DR ist oder fehlt; X6 N oder T ist; X7 P oder T ist; X8 D oder E ist; 9 S oder T ist; X10 F oder Y ist; X11 T oder A ist; X12 A oder Y ist; X13 Y oder D ist; X14 A oder E ist; X15 V oder M ist;

X16 I oder F ist; X17 P oder S ist; X18 P oder T ist; X19 T oder S ist; X20 D oder S ist; X21 N oder S ist; X22 C oder R ist; X23 G oder N ist; X24 G oder D ist; X25 G oder Q ist; X26 V oder D ist; X27 Q oder K ist; X28 G ist oder fehlt; X29 R oder K ist; X30 C oder S oder V ist; X31 A oder G ist; X32 G oder A ist; X33 S oder G ist; X34 G oder S ist; X35 G oder Y ist; X36 N oder S oder T oder K ist; X37 S oder G ist; X38 L oder P ist; X39 A oder M ist; X40 M oder V ist; X41 P oder F ist.

In Anlehnung an das oben beschriebene Verfahren werden zwei weitere Verfahren zum Herstellen der Mistellektin-A-Kette und der Mistellektin-B-Kette oder einem Fragment davon bereitgestellt, welche die folgenden Sequenzen oder ein Fragment davon umfassen:

Mistellektin-A:

Y E R L R L R V T H Q T T G X1 E Y F R F I T L
 L R D Y V S S G S F S N E I P L L R Q S T I P
 V S D A Q R F V L V E L T N Q G X2 D S X3 T A A
 I D V T N X4 Y V V A Y Q A G D Q S Y F L R D A
 P R G A E T H L F T G T T R X5 S S L P F X6 G S
 Y X7 D L E R Y A G H R D Q I P L G I X8 Q L I Q
 S V X9 A L R X10 P G G S T R X11 Q A R S I L I L
 I Q M I S E A A R F N P I L W R X12 R Q X13 I N
 S G X14 S F L P D X15 Y M L E L E T S W G Q Q S
 T Q V Q H S T D G V F N N P X16 R L A I X17 X18 G
 N F V T L X19 N V R X20 V I A S L A I M L F V C

G E R P S S S

Mistellektin-B:

D D V T C S A S E P T V R I V G R X21 G M X22 V D

V R D D D F H D G N Q I Q L W P S K S N N D P N

Q L W T I K R D X23 T I R S N G S C L T T Y G Y

T A G V Y V M I F D C N T A V R E A T I W Q I W

X24 N G T I I N P R S N L V L A A S S G I K G T T

L T V Q T L D Y T L G Q G W L A G N D T A P R E

V T I Y G F R D L C M E S N X25 G S V W V E T C

X26 S S Q X27 N Q X28 X29 W A L Y G D G S I R P K Q N

Q D Q C L T X30 G R D S V S T V I N I V S C S X31

X32 S X33 X34 Q R W V F T N E X35 A I L N L K X36 X37

X38 X39 X40 D V A Q A N P K L R R I I I Y P A T G

K P N Q M W L P V X41

Ein erfindungsgemäßes Verfahren zum Bereitstellen eines Nukleinsäuremoleküls, das in einer Mistelzelle oder einer transgenen Mistelpflanze für die oben erwähnten Mistellektin-Polypeptide kodiert, umfaßt die folgenden Schritte:

- a) Präparieren von Mistelzell-RNA oder chromosomaler Mistelzell-DNA und

- b) Amplifizieren von Mistelzell-RNA oder chromosomaler Mistellektin-DNA durch PCR unter Verwendung von Oligonukleotiden, die von der in Abb. 1b dargestellten Mistellektin abgeleitet sind, und
- c) gegebenenfalls Identifizieren von Sequenzen, die 5' und 3' von der amplifizierten Nukleinsäure liegen sowie deren Amplifikation, und
- d) Isolieren der in Schritt b) und/oder c) isolierten Nukleinsäuremoleküle, und
- e) gegebenenfalls Ligieren mehrerer der in Schritt b) und/oder c) isolierten Nukleinsäuremoleküle, so daß ein Nukleinsäuremolekül mit vollständigem offenen Leseraster erhalten, und
- f) gegebenenfalls gezieltes Mutieren des erhaltenen Nukleinsäuremoleküls, um das Nukleinsäuremolekül dem üblichen genetischen Code für eine der in Mistelzellen identifizierten Mistellektin-Polypeptidisoformen anzupassen und/oder die Expression zu optimieren.

Zuerst wird pflanzliche RNA oder DNA vorzugsweise aus Frischmaterial durch verschiedene, allgemein bekannte Verfahren isoliert (Quiagen Versuchsprotokoll, Nickrent, D.L. et al., American Journal of Botany, v.81, n.9, (1994): 1149-1160; Beispiel 1). Unter Verwendung der im Beispiel 1 beschriebenen degenerierten Oligonukleotide BI und BII, die von dem in Abbildung 1b dargestellten Mistellektin-Polypeptid abgeleitet sind, wird das Mistellektin- I-Gen in einer PCR-Reaktion, deren Bedingungen in Beispiel 2 aufgeführt sind, amplifiziert. Falls dieser Amplifikationsschritt nicht das vollständige offene Leseraster von ML-I umfaßt, kann unter Verwendung der RACE-Technik mit den in Beispiel 3 angegebenen entsprechenden Oligonukleotiden der 5'- und 3'-Bereich der amplifizierten Nukleinsäuren identifiziert werden. Die so gewonnenen Nukleinsäuremoleküle werden isoliert und gegebenenfalls unter Verwendung geeigneter Restriktionsschnittstellen so in einen Vektor ligiert, daß dieser das vollständige offene Leseraster enthält. Ein in diesem Vektor enthaltenes Nukleinsäuremolekül oder ein Fragment davon, das in einer Mistelzelle oder einer transgenen Mistelpflanze für ein wie oben beschriebenes Polypeptid kodiert, umfaßt die folgende Sequenz:

1) ML-I-Sequenz:

TACGAGAGGCTAAGACTCAGAGTTACGCATCAAACCACGGGCGAKGAATACTTCCGGTTCATCAGG
CTTCTCCGAGATTATGTCTCAAGCGGAAGCTTTTCCAATGAGATACCACTCTTGCGTCAGTCTACG
ATCCCCGTCTCCGATGCGCAAAGATTGTCTTGGTGGAGCTCACCAACCAGGGGSRRGACTCGRTY
ACGGCCGCCATCGACGTTACCAATSYKTACGTCGTGGCTTACCAAGCAGGCGACCAATCCTACTTT
TTGCGCGACGCACCACGCGGCGCGGAAACGCACCTCTTCACCGGCACCACCCGAZ1TCCTCTCTCC
CATTCAMYGGAAGCTACMCYGATCTGGAGCGATACGCCGGACATAGGGACCAGATCCCTCTCGGTA
TAGASCAACTCATTCAATCCGTCWCKGCGCTTCGTTWYCCGGGCGGCAGCACGCGTRCYCAAGCTC
GTTGATTTTAAATCCTCATTAGATGATCTCCGAGGCCGCCAGATTCAATCCCATCTTATGGAGGK
~~MYCGCCAAKAYATTAAGAGTGGGGMRTGATTTCTGCCAGACRTGTACATGCTGGAGCTGGAGACGA~~
GTTGGGGCCAACAATCCACGCAAGTCCAGCATTCAACCGATGGCGTTTTTAATAACCCAWTYCGGT
TGGCTATAYCYMCYGGTAACTTCGTGACGTTWCYAATGTTGCKMYGTGATCGCCAGCTTGGCGA
TCATGTTGTTTGTATGCGGAGAGCGGCCATCTTCCTCTGACGTGCGCTATTGGCCGCTGGTCATAC
GACCCGTGATAGCCGATGATGTTACCTGCAGTGCTTCGGAACCTACGGTGCGGATTGTGGGTGCGAA
RTGGCATGYGCGTGGACGTCCGAGATGACGATTTCCACGATGGGAATCAGATACAGTTGTGGCCCT
CCAAGTCCAACAATGATCCGAATCAGTTGTGGACGATCAAAGGGATRRMACCATTCGATCCAATG
GCAGCTGCTTGACCACGTATGGCTATACTGCTGGCGTCTATGTGATGATCTTCGACTGTAATACTG
CTGTGCGGGAGGCCACTATTTGGCAGATATGGGRCAATGGGACCATCATCAATCCAAGATCCAATC

TGGTTTTGGCAGCATCATCTGGAATCAAAGGCACTACGCTTACGGTGCAAACACTGGATTACACGT
 TGGGACAGGGCTGGCTTGCCGGTAATGATACGCCCCACGCGAGGTGACCATATATGGTTTCAGGG
 ACCTTTGCATGGAATCAAATSRAGGGAGTGTGTGGGTGGAGACGTGCGWSAGTAGCCAAMAGAACC
 AAZ2ARATGGGCTTTGTACGGGGATGGTTCTATACGCCCCAAACAAAACCAAGACCAATGCCTCAC
 CKBTGGGAGAGACTCCGTTTCAACAGTAATCAATATAGTTAGCTGCAGCGSWGSWTCGKSKKSKCA
 GCGATGGGTGTTTACCAATGAAKRSGCCATTTTGAATTTAAAGAVWRGSYYGRYSRTGGATGTGGC
 GCAAGCAAATCCAAAGCTCCGCCGAATAATTATCTATCCTGCCACAGGAAAACCAAATCAAATGTG
 GCTTCCCGTGYMTGA

Ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül oder ein Fragment davon, das in einer
 Mistelzelle oder einer transgenen Mistelpflanze für eine der oben erwähnten MLA-
 Polypeptide kodiert, umfaßt die folgende Sequenz:

II) MLA-Sequenz:

TACGAGAGGCTAAGACTCAGAGTTACGCATCAAACCACGGGCGAKGAATACTTCCGGTTCATCAG
 CTTCTCCGAGATTATGTCTCAAGCGGAAGCTTTTCCAATGAGATACCACTCTTGCGTCAGTCTACG
 ATCCCCGTCTCCGATGCGCAAAGATTTGTCTTGGTGGAGCTCACCAACCAGGGGSRRGACTCGRTY
 ACGGCCGCCATCGACGTTACCAATSYKTACGTCGTGGCTTACCAAGCAGGCGACCAATCCTACTTT
 TTGCGCGACGCACCACGCGGCGCGGAAACGCACCTCTTCACCGGCACCACCCGAZ1TCCTCTCTCC
 CATTCAMYGAAGCTACMCYGATCTGGAGCGATACGCCGGACATAGGGACCAGATCCCTCTCGGTA
 TAGASCAACTCATTCAATCCGTCWCKGCGCTTCGTTWYCCGGGCGGCAGCACGCGTRCYCAAGCTC

GTTTCGATTTTAATCCTCATTGATCTCCGAGGCCGCCAGATTCAATCCCATCTTATGGAGGK
MYCGCCAAKAYATTAACAGTGGGGMRTCATTTCTGCCAGACRTGTACATGCTGGAGCTGGAGACGA
GTTGGGGCCAACAATCCACGCAAGTCCAGCATTCAACCGATGGCGTTTTTAATAACCCAWTYCGGT
TGGCTATAYCYMCYGGTAACTTCGTGACGTTGWCYAATGTTGCKMYGTGATCGCCAGCTTGGCGA

Des weiteren wird ein Nukleinsäuremolekül oder ein Fragment davon, das in einer Mistelzelle oder in einer transgenen Mistelpflanze für eines der oben erwähnten MLB-Polypeptide kodiert, mit der folgenden Sequenz zur Verfügung gestellt:

III) MLB-Sequenz:

GATGATGTTACCTGCAGTGCTTCGGAACCTACGGTGCGGATTGTGGGTGGAARTGGCATGYGCGTG
GACGTCCGAGATGACGATTTCCACGATGGGAATCAGATACAGTTGTGGCCCTCCAAGTCCAACAAT
GATCCGAATCAGTTGTGGACGATCAAAGGGATRRMACCATTCGATCCAATGGCAGCTGCTTGACC
ACGTATGGCTATACTGCTGGCGTCTATGTGATGATCTTCGACTGTAATACTGCTGTGCGGGAGGCC
ACTATTTGGCAGATATGGGRCAATGGGACCATCATCAATCCAAGATCCAATCTGGTTTTGGCAGCA
TCATCTGGAATCAAAGGCACTACGCTTACGGTGCAAACACTGGATTACACGTTGGGACAGGGCTGG
CTTGCCGGTAATGATACCGCCCCACGCGAGGTGACCATATATGGTTTCAGGGACCTTTGCATGGAA
TCAAATSRAGGGAGTGTGTGGGTGGAGACGTGCGWSAGTAGCCAAMAGAACCAAZ2ARATGGGCTT
TGACGGGGATGGTTCTATACGCCCCAAACAAACCAAGACCAATGCCTCACCKBTGGGAGAGACT
CCGTTTCAACAGTAATCAATATAGTTAGCTGCAGCGSWGSWTCGKSKKSKCAGCGATGGGTGTTTA

CCAATGAARKRSGCCATTTTGAATTTAAAGAVWRGSYYGRYSRTGGATGTGGCGCAAGCAAATCCAA

AGCTCCGCCGAATAATTATCTATCCTGCCACAGGAAAACCAAATCAAATGTGGCTTCCCGTGYMT

GA

Die Nukleotide sind gemäß dem IUPAC-IUB Code definiert; Z₁ bezeichnet zusätzlich die Nukleotidsequenz GAT AGA oder fehlt, während Z₂ die Nukleotidsequenz GGC bezeichnet oder fehlt.

Ein spezifisches Nukleinsäuremolekül, das in einer Mistellzelle oder in einer transgenen Mistelpflanze exprimiert werden soll und für ML-I kodiert, ist in Abbildung 1a dargestellt. Desweiteren sind spezifische Nukleinsäuremoleküle zur Expression in Mistelzellen oder einer transgenen Mistelpflanze, die für MLA-Polypeptide kodieren, in Abbildungen 2a und 3a dargestellt; in Abbildungen 7a bis 12a werden Nukleinsäuresequenzen gezeigt, die für MLB-Polypeptide, wie oben beschrieben, kodieren und ebenfalls zur Expression in Mistelzellen und/oder transgenen Mistelpflanzen vorgesehen sind. Die Expression dieser rekombinanten Nukleinsäuren, die die im natürlichen Mistelextrakt vorgefundenen posttranskriptionalen Änderungen der Polypeptidketten bereits in ihrer DNA-Sequenz kodiert haben, hat gegenüber der Expression der natürlichen ML-I-DNA den Vorteil, daß erstens eine größere Menge an rekombinantem Protein erzeugt wird, da der teilweise limitierende Prozeß der posttranskriptionalen Modifikation entfällt und zweitens die Zusammensetzung eines Mistellektin I-Gemisches wesentlich besser kontrolliert werden kann. Es ist ebenfalls beabsichtigt, Mistellektin-Nukleinsäuremoleküle in Mistelzellen und/oder transgenen Mistelpflanzen zu exprimieren, die in ihrer Kodonverwendung so modifiziert sind, daß dadurch die Expressionsrate optimiert wird.

Des weiteren stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Herstellen eines der oben beschriebenen Polypeptide zur Verfügung, welches das Modifizieren von Zuckerseitenketten durch enzymatische und/oder chemische Ergänzung, Entfernung und/oder Änderung einer oder mehrerer Seitenketten umfaßt (Macindoe W.M. et al., Carbohydrate Research, 1995, 269 (2):227-57; Meynial-Salles I. & Combes D., J. Biotechnol., 1996, 46(1), 1-14; Wong S.Y., Current Opinion in Structural Biology, 1995, 5(5), 599-604). Dadurch kann die in vivo-Aktivität einzelner MLA- und/oder MLB-Ketten verstärkt oder abgeschwächt werden bzw. bei eventuellen Abweichungen in Abhängigkeit vom Expres-

sionssystem den natürlichen Mistellektinen optimal nachempfunden werden. Es ist ebenfalls vorgesehen, derartig modifizierte Mistellektine einer erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung zuzusetzen.

Die folgenden Abbildungen und Beispiele erläutern die Erfindung:

Abb. A: Darstellung eines Mistellektin-I-Dimers.

Abb. 1: Darstellung der (a) Nukleinsäuresequenz und (b) Aminosäuresequenz von ML I.

Abb. 2: Darstellung der (a) Nukleinsäuresequenz und (b) Aminosäuresequenz von Mistellektin A1.

Abb. 3: Darstellung der (a) Nukleinsäuresequenz und (b) Aminosäuresequenz von Mistellektin A2.

Abb.4: Darstellung der Nukleinsäuresequenz von ML I, wobei die Nukleinsäuresequenz dem Kodongebrauch von *Brassica* angepaßt ist.

Abb.5: Darstellung der Nukleinsäuresequenz von Mistellektin A1, wobei die Nukleinsäuresequenz dem Kodongebrauch von *Brassica* angepaßt ist.

Abb.6: Darstellung der Nukleinsäuresequenz von Mistellektion A2, wobei die Nukleinsäuresequenz dem Kodongebrauch von *Brassica* angepaßt ist.

Abb.7: Darstellung der (a) Nukleinsäuresequenz und (b) Aminosäuresequenz von Mistellektin B.

Abb.8: Darstellung der (a) Nukleinsäuresequenz und (b) Aminosäuresequenz von Mistellektin B1.

Abb.9: Darstellung der (a) Nukleinsäuresequenz und (b) Aminosäuresequenz von Mistellektin B2.

Abb. 10: Darstellung der (a) Nukleinsäuresequenz und (b) Aminosäuresequenz von Mistellektin B3.

- Abb. 11: Darstellung der (a) Nukleinsäuresequenz und (b) Aminosäuresequenz von Mistellektin B4.
- Abb. 12: Darstellung der (a) Nukleinsäuresequenz und (b) Aminosäuresequenz von Mistellektin B5.
- Abb. 13: Darstellung der Nukleinsäuresequenz von Mistellektin B, wobei die Nukleinsäuresequenz dem Kodongebrauch von *Brassica* angepaßt ist.
- Abb. 14: Darstellung der Nukleinsäuresequenz von Mistellektin B1, wobei die Nukleinsäuresequenz dem Kodongebrauch von *Brassica* angepaßt ist.
- Abb. 15: Darstellung der Nukleinsäuresequenz von Mistellektin B2, wobei die Nukleinsäuresequenz dem Kodongebrauch von *Brassica* angepaßt ist.
- Abb. 16: Darstellung der Nukleinsäuresequenz von Mistellektin B3, wobei die Nukleinsäuresequenz dem Kodongebrauch von *Brassica* angepaßt ist.
- Abb. 17: Darstellung der Nukleinsäuresequenz von Mistellektin B4, wobei die Nukleinsäuresequenz dem Kodongebrauch von *Brassica* angepaßt ist.
- Abb. 18: Darstellung der Nukleinsäuresequenz von Mistellektin B5, wobei die Nukleinsäuresequenz dem Kodongebrauch von *Brassica* angepaßt ist.

Beispiel 1

Es wurden Mistelpflanzen der Art *Viscum album* L. ssp. *platyspermum* Kell von im Elsaß wachsenden Pappeln geerntet und direkt nach der Ernte eingefroren. Das Pflanzenmaterial wurde im Labor in flüssigem Stickstoff zerstoßen und anschließend die DNA von 100 mg Pflanzenmaterial durch das im DNeasy Plant Mini-Handbook 09/96 von Quiagen beschriebene Verfahren isoliert.

Beispiel 2

PCR-Bedingungen zur Amplifikation von Mistellektin-I-DNA:

Für die Amplifikation von genomischer Mistellektin-I-DNA wurden 100 ng Template-DNA, präpariert wie in Beispiel 1 angegeben, in einer PCR-Reaktion mit 30 Zyklen unter Verwendung von Taq-Polymerase (Boehringer Mannheim) verwendet. Der Template-DNA wurden 1 µg Primer, MgCl₂ (Endkonzentration 2 mM), Nukleotidgemisch A, T, C, G (Endkonzentration 0,2 mM) und 2,5 Einheiten Taq-Polymerase zugesetzt. Die Reaktion wurde durch einen Denaturierungsschritt der DNA für 5 Minuten bei 94°C als Hotstart-PCR gestartet. Dabei vermischten sich das Enzym und die restlichen Reagenzien erst nach dem eine Wachsbarrriere zwischen den Komponenten geschmolzen war. Die 30 anschließenden Zyklen werden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Denaturierung	94°C	30 Sekunden
Annealing	55°C	30 Sekunden
Amplifikation	72°C	1 Minute

Im Anschluß an die 30 Zyklen wurde noch eine 7-minütige Verlängerungsreaktion bei 72°C durchgeführt, bevor die Reaktionsmischung auf 4°C heruntergekühlt wurde.

Die in der PCR-Reaktion eingesetzten Primer hybridisierten mit Fragmenten der für MLB kodierenden genomischen DNA und hatten die folgenden Sequenzen:

- B1. GTN MGN GAY GAY GAY TTY CA
B2: AT YTG RTT NGG YTT NCC NGT

Die Nukleotide sind gemäß dem IUPAC-IUB-Code definiert.

Das Oligonukleotid B1 hybridisierte an den Nukleinsäurebereich, der den Aminosäuren 24 bis 30 der MLB-Sequenz entspricht, während das Oligonukleotid B2 an die für die Aminosäuren 253-258 von MLB kodierende komplementäre DNA-Sequenz hybridisierte.

Beispiel 3

Um die angrenzenden 3'- und 5'-Sequenzen der in Beispiel 2 amplifizierten DNA zu ermitteln, wurde die RACE-Technik verwendet. 2 µg RNA-Template wurden in cDNA-Synthese Puffer (Endkonzentration: 20mM Tris-HCl, 8 mM MgCl₂, 30 mM KCl, 1 mM Dithiothreitol; pH 8,5 (20°C)) mit AMV reverser Transkriptase, den Deoxynukleotiden und dem spezifischen Primer (s.u.) versetzt und 60 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe 10 min bei 65°C inkubiert. Nach der Aufreinigung des ersten cDNA-Stranges wurde mit 2/5 der synthetisierten cDNA die "Tailing"-Reaktion mit terminaler Transferase durchgeführt. Nach der Tailing-Reaktion erfolgte eine PCR mit dem Oligo-dT-Anker-Primer und dem spezifischen Primer (Inkubationsbedingungen s.o., mit Ausnahme der Annealingtemperatur, die auf 50°C gesenkt wurde).

Zur Ermittlung der 5'-Bereiche der in Beispiel 2 amplifizierten Nukleinsäuremoleküle wird das Oligonukleotid mit folgender Sequenz benutzt:

CAC AGC AGT ATT ACA GTC GAA

Eine zu diesem Oligonukleotid komplementäre DNA-Sequenz kodiert die Aminosäuresequenz 79-85 des MLB-Polypeptides. Um in einem entsprechenden Experiment die 3'-Bereiche der amplifizierten Nukleinsäuremoleküle zu ermitteln, wurde das Oligonukleotid mit der folgenden Sequenz eingesetzt:

GTC TAT GTG ATG ATC TTC GAC TGT

Diese Nukleinsäuresequenz kodiert für den Aminosäurebereich 74-81 des MLB-Polypeptids. Für die 3'-RACE-Reaktion wurden dieselben Inkubationsbedingungen wie bei der 5'-RACE verwandt, mit Ausnahme der "Tailing"-Reaktion, die hier wegen des polyA-Schwanzes der mRNA nicht nötig ist. In beiden Verfahren wurde als zweiter Primer der Oligo-dT-Anker-Primer des Boehringer Mannheim Kits verwendet.

Beispiel 4

Pharmazeutische Zusammensetzung mit zytotoxischer Wirkung:

Mistel-, Tabak- und Rapszellen werden mit RNA-Vektoren, die für MLA1 und MLA2 kodieren, transfiziert, die Zellen jeweils nach einigen Tagen geerntet und die MLA1- und MLA2-Proteine durch Affinitätschromatographie gereinigt. Als Gelmaterial wird Divinylsulfon (DVS)-aktivierte Lactose-gekoppelte Sepharose 4B (Pharmacia) eingesetzt. Durch Behandlung mit 0,2 M HCl wird das Material aktiviert, d.h. die Sepharose-Struktur wird teilweise hydrolysiert und Zuckerbindungsstellen werden freigelegt, an welche die Lektine binden können. 100 ml Gelmaterial werden mit 0,2 M HCl in einem Büchner-Trichter gewaschen und in 200 ml 0,2 M HCl suspendiert. Durch 3,5-stündige Inkubation der Suspension bei 50°C im Wasserbad erfolgt die Hydrolyse des Gelmaterials. Die Suspension wird mit Wasser und anschließend mit Peptideluent (0,05 M $K_2HPO_4 \times 3H_2O$, 0,15 M NaCl, pH 7,0) säurefrei gewaschen. Dann wird die Suspension entgast, der Peptideluent abgesaugt, das zähflüssige Gelmaterial in eine Leersäule XK50/30 (3 x 50 cm; Pharmacia) gefüllt und mit Peptideluent pH 7,0 mit einer Fließgeschwindigkeit von zuerst 2,5 ml/min und dann 5 ml/min gepackt. Die Säule wird mit dem gleichen Eluent bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min equilibriert. Das aus den transfizierten Mistelzellen gewonnene Zellextrakt wird zentrifugiert und der Überstand auf die Säule geladen. Die Auftrennung wird bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min mit Peptideluent pH 7,0 durchgeführt. ~~Die Lektine werden vom Säulenmaterial mit einem Puffer aus~~ 0,2 M Lactose in Peptideluent pH 7,0 bei einer Fließgeschwindigkeit von 2 ml/min eluiert. Die Elution des Lektins von der Säule wird durch Messung der Absorption bei 206 nm gemessen. Die Lektin enthaltenden Fraktionen werden gesammelt, eingefroren und lyophilisiert. Falls gewünscht, kann ein weiterer Reinigungsschritt über eine HPLC-Säule erfolgen. Dazu eignet sich eine Vydac C4 300 A-Säule, die bei einer Fließgeschwindigkeit von 300 µl/min und einem Gradienten von 20% bis 100% B in 60 Minuten gefahren wird, wobei Elutionsmittel A 0,17% TFA in Wasser ist und Elutionsmittel B 0,15% TFA in 80% CH_3CN in Wasser ist. Die Elution der Mistellektine wird bei einer Wellenlänge von 214 nm detektiert.

Die gereinigten MLA1- und MLA 2-Polypeptide werden an ein geeignetes Zellerkennungsmolekül gekoppelt. Ist das Zellerkennungsmolekül ein mono- oder polyklonaler Antikörper, kann dieser z.B. unter Verwendung von Glutaraldehyd an das zytotoxische MLA1 oder MLA2 gebunden werden oder direkt als chimäres Fusionprotein (Antikörper-MLA) in den entsprechenden Expressionssystemen exprimiert werden.

Beispiel 5

Pharmazeutische Zusammensetzung:

Mistelzellen werden mit RNA-Vektoren transfiziert, die für die Mistellektine MLA1 und MLA2 sowie Mistellektine MLB bis MLB6 kodieren, transfiziert. Nach einigen Tagen werden die Mistellektinmonomere bzw. -dimere durch Verfahren wie in Beispiel 4 beschrieben aus den Mistelzellen extrahiert und gereinigt. Die so erhaltenen Monomere können in vitro zu heterologen und homologen Dimeren fusioniert werden. Auf diese Weise entsteht eine Vielzahl von unterschiedlichen Kombinationen der einzelnen MLA- und MLB-Polypeptide. Das so hergestellte heterogene Gemisch an ML- I-Dimeren und - Monomeren wird lyophilisiert und zur Formulierung mit einem geeigneten Träger verwendet.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Herstellen eines Mistellektin-Polypeptides im heterologen System mit der Sequenz:

```

Y E R L R L R V T H Q T T G X1 E Y F R F I T L
L R D Y V S S G S F S N E I P L L R Q S T I P
V S D A Q R F V L V E L T N Q G X2 D S X3 T A A
I D V T N X4 Y V V A Y Q A G D Q S Y F L R D A
P R G A E T H L F T G T T R X5 S S L P F X6 G S
Y X7 D L E R Y A G H R D Q I P L G I X8 Q L I Q
S V X9 A L R X10 P G G S T R X11 Q A R S I L I L

I Q M I S E A A R F N P I L W R X12 R Q X13 I N
S G X14 S F L P D X15 Y M L E L E T S W G Q Q S
T Q V Q H S T D G V F N N P X16 R L A I X17 X18 G
N F V T L X19 N V R X20 V I A S L A I M L F V C
G E R P S S S D V R Y W P L V I R P V I A D D
V T C S A S E P T V R I V G R X21 G M X22 V D V
R D D D F H D G N Q I Q L W P S K S N N D P N
Q L W T I K R D X23 T I R S N G S C L T T Y G Y
T A G V Y V M I F D C N T A V R E A T I W Q I

```

14 05 03 99

W X24 N G T I I N P R S N L V L A A S S G I K G
T T L T V Q T L D Y T L G Q G W L A G N D T A
P R E V T I Y G F R D L C M E S N X25 G S V W V
E T C X26 S S Q X27 N Q X28 X29 W A L Y G D G S I R
P K Q N Q D Q C L T X30 G R D S V S T V I N I V
S C S X31 X32 S X33 X34 Q R W V F T N E X35 A I L N
L K X36 X37 X38 X39 X40 D V A Q A N P K L R R I I I
Y P A T G K P N Q M W L P V X41

oder eines Fragmentes davon, umfassend den Schritt des Expressierens mit Hilfe eines eukaryontischen oder prokaryontischen Vektors, in den eine nach dem üblichen genetischen Code für das Mistellektin-Polypeptid oder ein Fragment davon kodierenden Nukleinsäure kloniert ist, in einem geeigneten heterologen eukaryontischen oder prokaryontischen Wirt,

wobei X1 D oder E ist; X2 G oder Q ist; X3 I oder V ist; X4 L oder A ist; X5 DR ist oder fehlt; X6 N oder T ist; X7 P oder T ist; X8 D oder E ist; X9 S oder T ist; X10 F oder Y ist; X11 T oder A ist; X12 A oder Y ist; X13 Y oder D ist; X14 A oder E ist; X15 V oder M ist; X16 I oder F ist; X17 P oder S ist; X18 P oder T ist; X19 T oder S ist; X20 D oder S ist; X21 N oder S ist; X22 C oder R ist; X23 G oder N ist; X24 G oder D ist; X25 G oder Q ist; X26 V oder D ist; X27 Q oder K ist; X28 G ist oder fehlt; X29 R oder K ist; X30 C oder S oder V ist; X31 A oder G ist; X32 G oder A ist; X33 S oder G ist; X34 G oder S ist; X35 G oder Y ist; X36 N oder S oder T oder K ist; X37 S oder G ist; X38 L oder P ist; X39 A oder M ist; X40 M oder V ist; X41 P oder F ist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Mistellektin-Polypeptid der Mistellektin-A-Kette (MLA) oder einem Fragment davon entspricht und die folgende Sequenz oder ein Fragment davon umfaßt:

Y E R L R L R V T H Q T T G X1 E Y F R F I T L
 L R D Y V S S G S F S N E I P L L R Q S T I P
 V S D A Q R F V L V E L T N Q G X2 D S X3 T A A
 I D V T N X4 Y V V A Y Q A G D Q S Y F L R D A
 P R G A E T H L F T G T T R X5 S S L P F X6 G S
 Y X7 D L E R Y A G H R D Q I P L G I X8 Q L I Q
 S V X9 A L R X10 P G G S T R X11 Q A R S I L I L
 I Q M I S E A A R F N P I L W R X12 R Q X13 I N
 S G X14 S F L P D X15 Y M L E L E T S W G Q Q S
 T Q V Q H S T D G V F N N P X16 R L A I X17 X18 G
 N F V T L X19 N V R X20 V I A S L A I M L F V C
 G E R P S S S

wobei X1 bis X20 die oben angegebene Bedeutung haben.

3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Mistellektin-Polypeptid der Mistellektin-B-Kette (MLB) oder einem Fragment davon entspricht und die folgende Sequenz oder ein Fragment davon umfaßt:

41 05 03 99

D D V T C S A S E P T V R I V G R X21 G M X22 V D
V R D D D F H D G N Q I Q L W P S K S N N D P N
Q L W T I K R D X23 T I R S N G S C L T T Y G Y
T A G V Y V M I F D C N T A V R E A T I W Q I W
X24 N G T I I N P R S N L V L A A S S G I K G T T
L T V Q T L D Y T L G Q G W L A G N D T A P R E
V T I Y G F R D L C M E S N X25 G S V W V E T C
X26 S S Q X27 N Q X28 X29 W A L Y G D G S I R P K Q N
Q D Q C L T X30 G R D S V S T V I N I V S C S X31
X32 S X33 X34 Q R W V F T N E X35 A I L N L K X36 X37
X38 X39 X40 D V A Q A N P K L R R I I I Y P A T G
K P N Q M W L P V X41

wobei X21 bis X41 die oben angegebene Bedeutung haben.

4. Mistellektin-Polypeptid mit der Sequenz:

Y E R L R L R V T H Q T T G X1 E Y F R F I T L
L R D Y V S S G S F S N E I P L L R Q S T I P
V S D A Q R F V L V E L T N Q G X2 D S X3 T A A
I D V T N X4 Y V V A Y Q A G D Q S Y F L R D A
P R G A E T H L F T G T T R X5 S S L P F X6 G S

42 05.03.99

Y X7 D L E R Y A G H R D Q I P L G I X8 Q L I Q

S V X9 A L R X10 P G G S T R X11 Q A R S I L I L

I Q M I S E A A R F N P I L W R X12 R Q X13 I N

S G X14 S F L P D X15 Y M L E L E T S W G Q Q S

T Q V Q H S T D G V F N N P X16 R L A I X17 X18 G

N F V T L X19 N V R X20 V I A S L A I M L F V C

G E R P S S S D V R Y W P L V I R P V I A D D

V T C S A S E P T V R I V G R X21 G M X22 V D V

R D D D F H D G N Q I Q L W P S K S N N D P N

Q L W T I K R D X23 T I R S N G S C L T T Y G Y

T A G V Y V M I F D C N T A V R E A T I W Q I

W X24 N G T I I N P R S N L V L A A S S G I K G

T T L T V Q T L D Y T L G Q G W L A G N D T A

P R E V T I Y G F R D L C M E S N X25 G S V W V

E T C X26 S S Q X27 N Q X28 X29 W A L Y G D G S I R

P K Q N Q D Q C L T X30 G R D S V S T V I N I V

S C S X31 X32 S X33 X34 Q R W V F T N E X35 A I L N

L K X36 X37 X38 X39 X40 D V A Q A N P K L R R I I I

Y P A T G K P N Q M W L P V X41

oder ein Fragment davon,

wobei X1 D oder E ist; X2 G oder Q ist; X3 I oder V ist; X4 L oder A ist; X5 DR ist oder fehlt; X6 N oder T ist; X7 P oder T ist; X8 D oder E ist; X9 S oder T ist; X10 F oder Y ist; X11 T oder A ist; X12 A oder Y ist; X13 Y oder D ist; X14 A oder E ist; X15 V oder M ist; X16 I oder F ist; X17 P oder S ist; X18 P oder T ist; X19 T oder S ist; X20 D oder S ist; X21 N oder S ist; X22 C oder R ist; X23 G oder N ist; X24 G oder D ist; X25 G oder Q ist; X26 V oder D ist; X27 Q oder K ist; X28 G ist oder fehlt; X29 R oder K ist; X30 C oder S oder V ist; X31 A oder G ist; X32 G oder A ist; X33 S oder G ist; X34 G oder S ist; X35 G oder Y ist; X36 N oder S oder T oder K ist; X37 S oder G ist; X38 L oder P ist; X39 A oder M ist; X40 M oder V ist; X41 P oder F ist.

5. Mistellektin-Polypeptid nach Anspruch 4, umfassend die Sequenz:

Y E R L R L R V T H Q T T G X1 E Y F R F I T L
L R D Y V S S G S F S N E I P L L R Q S T I P
V S D A Q R F V L V E L T N Q G X2 D S X3 T A A
I D V T N X4 Y V V A Y Q A G D Q S Y F L R D A
P R G A E T H L F T G T T R X5 S S L P F X6 G S
Y X7 D L E R Y A G H R D Q I P L G I X8 Q L I Q
S V X9 A L R X10 P G G S T R X11 Q A R S I L I L
I Q M I S E A A R F N P I L W R X12 R Q X13 I N
S G X14 S F L P D X15 Y M L E L E T S W G Q Q S
T Q V Q H S T D G V F N N P X16 R L A I X17 X18 G
N F V T L X19 N V R X20 V I A S L A I M L F V C

G E R P S S S

oder ein Fragment dieser Sequenz, wobei das Mistellektin-Polypeptid der MLA-Kette oder einem Fragment davon entspricht und X1 bis X20 die oben angegebene Bedeutung haben.

6. Mistellektin-Polypeptid nach Anspruch 4, umfassend die Sequenz:

D D V T C S A S E P T V R I V G R X21 G M X22 V D
V R D D D F H D G N Q I Q L W P S K S N N D P N
Q L W T I K R D X23 T I R S N G S C L T T Y G Y
T A G V Y V M I F D C N T A V R E A T I W Q I W
X24 N G T I I N P R S N L V L A A S S G I K G T T
L T V Q T L D Y T L G Q G W L A G N D T A P R E
V T I Y G F R D L C M E S N X25 G S V W V E T C
X26 S S Q X27 N Q X28 X29 W A L Y G D G S I R P K Q N
Q D Q C L T X30 G R D S V S T V I N I V S C S X31
X32 S X33 X34 Q R W V F T N E X35 A I L N L K X36 X37
X38 X39 X40 D V A Q A N P K L R R I I I Y P A T G
K P N Q M W L P V X41

oder ein Fragment dieser Sequenz, wobei das Mistellektin-Polypeptid der MLB-Kette oder einem Fragment davon entspricht und X21 bis X41 die oben angegebene Bedeutung haben.

7. Mistellektin-Polypeptid nach Anspruch 4, mit der in Abb. 1b dargestellten Sequenz.

8. Mistellektin-Polypeptid nach Anspruch 5, mit der in Abb. 3b dargestellten Sequenz.

9. Mistellektin-Polypeptid nach Anspruch 6, ausgewählt aus der folgenden Gruppe:

- I) Polypeptid mit der in Abb. 7b dargestellten Sequenz,
- II) Polypeptid mit der in Abb. 8b dargestellten Sequenz,
- III) Polypeptid mit der in Abb. 9b dargestellten Sequenz,
- IV) Polypeptid mit der in Abb. 10b dargestellten Sequenz,
- V) Polypeptid mit der in Abb. 11b dargestellten Sequenz,
- VI) Polypeptid mit der in Abb. 12b dargestellten Sequenz.

10. Verfahren zum Bereitstellen eines Nukleinsäuremoleküls, das in einem heterologen Wirt für ein Mistellektin-Polypeptid nach Anspruch 4 kodiert, umfassend die Schritte:

- a) Präparieren von Mistelzell-RNA oder chromosomaler Mistelzell-DNA und
- b) Amplifizieren von Mistelzell-RNA oder chromosomaler Mistellektin-DNA durch PCR unter Verwendung von Oligonukleotiden, die von dem in Abb. 1b dargestellten Mistellektin-Polypeptid abgeleitet sind, und
- c) gegebenenfalls Identifizieren von Sequenzen, die 5' und 3' von der amplifizierten Nukleinsäure liegen sowie deren Amplifikation, und
- d) Isolieren der in Schritt b) und/oder c) amplifizierten Nukleinsäuremoleküle, und

- e) gegebenenfalls Ligieren mehrerer der in Schritt b) und/oder c) amplifizierten Nukleinsäuremoleküle, so daß ein Nukleinsäuremolekül mit vollständigem offenen Leseraster erhalten wird und
- f) gezieltes Mutieren des erhaltenen Nukleinsäuremoleküls, um das Nukleinsäuremolekül dem üblichen genetischen Code des heterologen Wirtes für eine der in Mistelzellen identifizierten Mistellektin-Polypeptidisoformen anzupassen.

11. Nukleinsäuremolekül, kodierend für ein Polypeptid nach Anspruch 4 und umfassend die Sequenz:

TACGAGAGGCTAAGACTCAGAGTTACGCATCAAACCACGGGCGAKGAATACTTCCGGTTCATCAGG
CTTCTCCGAGATTATGTCTCAAGCGGAAGCTTTTCCAATGAGATACCACTCTTGCGTCAGTCTACG
ATCCCCGTCTCCGATGCGCAAAGATTTGTCTTGGTGGAGCTCACCAACCAGGGGSRRGACTCGRTY
ACGGCCGCCATCGACGTTACCAATSYKTACGTCGTGGCTTACCAAGCAGGCGACCAATCCTACTTT
TTGCGCGACGCACCACGCGGCGCGGAAACGCACCTCTTCACCGGCACCACCCGAZ1TCCTCTCTCC
CATTCAMYGGAAGCTACMCYGATCTGGAGCGATACGCCGGACATAGGGACCAGATCCCTCTCGGTA
TAGASCAACTCATTCAATCCGTCWCKGCGCTTCGTTWYCCGGGCGGCAGCACGCGTRCYCAAGCTC
GTTGATTTTAAATCCTCATTAGATGATCTCCGAGGCCGCGAGATTCAATCCCATCTTATGGAGGK
MYCGCCAAKAYATTAACAGTGGGGMRTCATTTCTGCCAGACRTGTACATGCTGGAGCTGGAGACGA
GTTGGGGCCAACAATCCACGCAAGTCCAGCATTCAACCGATGGCGTTTTTAATAACCCAWTYCGGT
TGGCTATAYCYMCYGGTAACTTCGTGACGTTGWCYAAATGTTGCKMYGTGATCGCCAGCTTGGCGA
TCATGTTGTTTGTATGCGGAGAGCGGCCATCTTCTCTGACGTGCGCTATTGGCCGCTGGTCATAC

GACCCGTGATAGCCGATGATGTTACCTGCAGTGCTTCGGAACCTACGGTGCGGATTGTGGGTCGAA
 RTGGCATGYGCGTGGACGTCCGAGATGACGATTTCACGATGGGAATCAGATACAGTTGTGGCCCT
 CCAAGTCCAACAATGATCCGAATCAGTTGTGGACGATCAAAAGGGATRRMACCATTCGATCCAATG
 GCAGCTGCTTGACCACGTATGGCTATACTGCTGGCGTCTATGTGATGATCTTCGACTGTAATACTG
 CTGTGCGGGAGGCCACTATTTGGCAGATATGGGRCAATGGGACCATCATCAATCCAAGATCCAATC
 TGGTTTTGGCAGCATCATCTGGAATCAAAGGCACTACGCTTACGGTGCAAACACTGGATTACACGT
 TGGGACAGGGCTGGCTTGCCGGTAATGATACCGCCCCACGCGAGGTGACCATATATGGTTTCAGGG
 ACCTTTGCATGGAATCAAATSRAGGGAGTGTGTGGGTGGAGACGTGCGWSAGTAGCCAAMAGAACC
 AAZ2ARATGGGCTTTGTACGGGGATGGTTCTATACGCCCCAAACAAAACCAAGACCAATGCCTCAC
 CKBTGGGAGAGACTCCGTTTCAACAGTAATCAATATAGTTAGCTGCAGCGSWGSWTCGKSKKSKCA
 GCGATGGGTGTTTACCAATGAAKRSGCCATTTTGAATTTAAAGAVWRGSYYGRYSRTGGATGTGGC
 GCAAGCAAATCCAAAGCTCCGCCGAATAATTATCTATCCTGCCACAGGAAAACCAAATCAAATGTG
 GCTTCCCGTGYYMTGA

oder ein Fragment davon, wobei die Nukleotide gemäß dem IUPAC-IUB Code definiert sind, und Z₁ die Nukleotidsequenz GAT AGA bezeichnet oder fehlt und Z₂ die Nukleotidsequenz GGC bezeichnet oder fehlt.

12. Nukleinsäuremolekül, das in einem heterologen Wirt für ein Polypeptid nach Anspruch 5 kodiert, umfassend die Sequenz:

TACGAGAGGCTAAGACTCAGAGTTACGCATCAAACCACGGGCGAKGAATACTTCGGTTTCATCACG

CTTCTCCGAGATTATGTCTCAAGCGGAAGCTTTTCCAATGAGATACCACTCTTGCGTCAGTCTACG
 ATCCCCGTCTCCGATGCGCAAAGATTGTCTTGGTGGAGCTCACCAACCAGGGGSRRGACTCGRTY
 ACGGCCGCCATCGACGTTACCAATSYKTACGTCGTGGCTTACCAAGCAGGCGACCAATCCTACTTT
 TTGCGCGACGCACCACGCGGCGCGGAAACGCACCTCTTCACCGGCACCACCCGAZ1 TCCTCTCTCC
 CATT CAMYGGAAGCTACMCYGATCTGGAGCGATACGCCGGACATAGGGACCAGATCCCTCTCGGTA
 TAGASCAACTCATTCAATCCGTCWCKGCGCTTCGTTWYCCGGGCGGCAGCACGCGTRCYCAAGCTC
 GTTCGATTTTAATCCTCATT CAGATGATCTCCGAGGCCGCCAGATTCAATCCCATCTTATGGAGGK
 MYCGCCAAKAYATTAACAGTGGGGMRTCATTTCTGCCAGACRTGTACATGCTGGAGCTGGAGACGA
 GTTGGGGCCAACAATCCACGCAAGTCCAGCATTCAACCGATGGCGTTTTTAATAACCCAWTYCGGT
 TGGCTATAYCYMCYGGTAACTTCGTGACGTTGWCYAATGTTGCKMYGTGATCGCCAGCTTGCGGA

TCATGTTGTTTGTATGCGGAGAGCGGCCATCTTCCTCT

oder ein Fragment davon, wobei die Nukleotide gemäß dem IUPAC-IUB Code definiert sind, und Z₁ die Nukleotidsequenz GAT AGA bezeichnet oder fehlt.

13. Nukleinsäuremolekül, das in einem heterologen Wirt für ein Polypeptid nach Anspruch 6 kodiert, umfassend die Sequenz:

GATGATGTTACCTGCAGTGCTTCGGAACCTACGGTGCGGATTGTGGGTGGAARTGGCATGYGCGTG
 GACGTCCGAGATGACGATTCCACGATGGGAATCAGATACAGTTGTGGCCCTCCAAGTCCAACAAT
 GATCCGAATCAGTTGTGGACGATCAAAGGGATRRMACCATTCGATCCAATGGCAGCTGCTTGACC
 ACGTATGGCTATACTGCTGGCGTCTATGTGATGATCTTCGACTGTAATACTGCTGTGCGGGAGGCC

ACTATTTGGCAGATATGGGRCAATGGGACCATCATCAATCCAAGATCCAATCTGGTTTTGGCAGCA
 TCATCTGGAATCAAAGGCACTACGCTTACGGTGCAAACACTGGATTACACGTTGGGACAGGGCTGG
 CTTGCCGGTAATGATACCGCCCCACGCGAGGTGACCATATATGGTTTCAGGGACCTTTGCATGGAA
 TCAAATSRAGGGAGTGTGTGGGTGGAGACGTGCGWSAGTAGCCAAMAGAACCAAZ2ARATGGGCTT
 TGTACGGGGATGGTTCTATACGCCCCAAACAAAACCAAGACCAATGCCTCACCKBTGGGAGAGACT
 CCGTTTCAACAGTAATCAATATAGTTAGCTGCAGCGSWGSWTCGKSKKSKCAGCGATGGGTGTTTA
 CCAATGAAKRSGCCATTTTGAATTTAAAGAVWRGSYYGRYSRTGGATGTGGCGCAAGCAAATCCAA
 AGCTCCGCCGAATAATTATCTATCCTGCCACAGGAAAACCAAATCAAATGTGGCTTCCCGTGYYMT
 GA

oder ein Fragment davon, wobei die Nukleotide gemäß dem IUPAC-IUB Code definiert sind und Z₂ die Nukleotidsequenz GGC bezeichnet oder fehlt.

14. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 11, mit der in Abb. 1a dargestellten Sequenz.

15. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 12, ausgewählt aus der folgenden Gruppe:

- I) Nukleinsäure mit der in Abb. 2a dargestellten Sequenz,
- II) Nukleinsäure mit der in Abb. 3a dargestellten Sequenz,

oder ein Fragment davon.

16. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 13, ausgewählt aus der folgenden Gruppe:

- I) Nukleinsäure mit der in Abb. 7a dargestellten Sequenz,

- II) Nukleinsäure mit der in Abb. 8a dargestellten Sequenz,
- III) Nukleinsäure mit der in Abb. 9a dargestellten Sequenz,
- IV) Nukleinsäure mit der in Abb. 10a dargestellten Sequenz,
- V) Nukleinsäure mit der in Abb. 11a dargestellten Sequenz,
- VI) Nukleinsäure mit der in Abb. 12a dargestellten Sequenz,

oder ein Fragment davon.

17. Nukleinsäuremolekül, kodierend für ein Mistellektin-Polypeptid nach mindestens einem der Ansprüche 4 bis 9 oder für ein Fragment davon, wobei der Codongebrauch an die Bedürfnisse eines heterologen Wirtes angepaßt ist.

18. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 17 mit der in Abb. 4a dargestellten Sequenz, wobei der Codongebrauch an die bevorzugte Codonverwendung der Gattung *Brassica* angepaßt ist.

19. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 17, ausgewählt aus der folgenden Gruppe:

- I) Nukleinsäure mit der in Abb. 5a dargestellten Sequenz,
- II) Nukleinsäure mit der in Abb. 6a dargestellten Sequenz,

20. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 17, ausgewählt aus der folgenden Gruppe:

- I) Nukleinsäure mit der in Abb. 13a dargestellten Sequenz,
- II) Nukleinsäure mit der in Abb. 14a dargestellten Sequenz,
- III) Nukleinsäure mit der in Abb. 15a dargestellten Sequenz,
- IV) Nukleinsäure mit der in Abb. 16a dargestellten Sequenz,
- V) Nukleinsäure mit der in Abb. 17a dargestellten Sequenz,

VI) Nukleinsäure mit der in Abb. 18a dargestellten Sequenz.

21. Vektor, der ein Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 11 bis 20 oder ein Fragment davon und einen damit funktionell verbundenen Promotor umfaßt.
22. Vektor nach Anspruch 21, wobei der Promotor ein für eine vorgesehene Wirtszelle spezifischer Promotor ist.
23. Vektor nach Anspruch 21 und/oder 22, wobei der Vektor ein RNA-Vektor ist.
24. Wirtszelle zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 3, welche eine Bakterienzelle, eine Pflanzenzelle mit Ausnahme einer Mistelzelle, eine Insektenlarve, eine Insektenzelle, eine Vertebratenzelle, bevorzugt eine Säugerzelle, eine Hefezelle, eine Pilzzelle, ein transgener Vertebrat und/oder eine transgene Pflanze mit Ausnahme einer Mistelpflanze sein kann und ein Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 11 bis 20 oder einen Vektor nach einem der Ansprüche 21 bis 23 enthält.
25. Wirtszelle nach Anspruch 24, wobei die Bakterienzelle *Escherichia coli* ist und/oder die Pflanzenzelle eine Rapszelle ist und/oder die Insektenlarve *Trichoplusia ni* ist und/oder die Insektenzelle eine *Spodoptera frugiperda* Zelle und/oder der Vertebrat ein Zebrafisch ist.
26. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend mindestens ein Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 11 bis 20 oder mindestens einen Vektor nach einem der Ansprüche 21 bis 23.
27. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 26, weiterhin umfassend Liposomen.
28. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 27, wobei die Liposomen auf ihrer Oberfläche Zellerkennungsmoleküle tragen, wobei das Zellerkennungsmolekül Zielzellen selektiv bindet.

29. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 26, weiterhin umfassend MLB-Polypeptid nach einem der Ansprüche 6 oder 9.

30. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 29, wobei das MLB-Polypeptid oder das Nukleinsäuremolekül oder der Vektor an ein Zellerkennungsmolekül gekoppelt ist, wobei das Zellerkennungsmolekül Zielzellen selektiv bindet.

31. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 26, wobei die Nukleinsäure oder der Vektor mit einem Viruspartikel assoziiert sind.

32. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 31, wobei der Viruspartikel auf seiner Oberfläche ein Zellerkennungsmolekül trägt, wobei das Zellerkennungsmolekül Zielzellen selektiv bindet.

33. Pharmazeutische Zusammensetzung, die mindestens ein Polypeptid nach Anspruch 4 bis 9 und/oder ein Fragment davon umfaßt.

34. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 33, weiterhin umfassend ein geeignetes Zellerkennungsmolekül, wobei das Zellerkennungsmolekül Zielzellen selektiv bindet.

35. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 34, wobei das Zellerkennungsmolekül ausgewählt ist aus der Antikörpermoleküle oder Antikörper-Fragmente, Zellrezeptor-Liganden, Peptidhormone oder Fragmenten davon, umfassenden Gruppe.

36. Verwendung eines Mistellektin-Polypeptids nach mindestens einem der Ansprüche 4 bis 9 und/oder eines Fragmentes davon zum Herstellen eines Medikamentes zum Behandeln von unkontrolliertem Zellwachstum.

37. Verwendung eines Mistellektin-Polypeptids nach mindestens einem der Ansprüche 4 bis 9 und/oder eines Fragments davon ohne zytotoxische Aktivität zum Herstellen eines Medikamentes, das die Immunreaktion verstärkt.

11.05.00.00

38. Verwendung nach Anspruch 37, wobei das Medikament ein weiteres Antigen umfaßt.

39. Verwendung nach Anspruch 38, wobei das weitere Antigen ein tumorphinduziertes Antigen, ein bakterielles oder virales Antigen ist.

40. Verfahren zum Herstellen eines Mistellektein-Polypeptides in Mistelzellen und/oder einer transgenen Mistelpflanze mit der Sequenz:

X E R L R L R V T H Q T T G X L E Y F R F I T L
L R D Y V S S G S F S N E I P L L R Q S T I P
V S D A Q R F V L V E L T N Q G X Z D S X 3 T A A
I D V T N X 4 Y V V A X Q A G D Q S Y F L R D A
P R G A E T H L F T G T R X 5 S S L P F X 6 G S
X 7 D L E R Y A G H R D Q I P L G I X 8 Q L I Q
S V X 9 A L R X 10 P G G S T R X 11 Q A R S I L I L
I Q M I S E A A R F N P I L W R X 12 R Q X 13 I N
S G X 14 S F L P D X 15 Y M L E L E T S W G Q Q S
T Q V Q H S T D G V F N N P X 16 R L A I X 17 X 18 G
N F V T L X 19 N V R X 20 V I A S L A I M L F V C
G E R P S S S D V R Y W P L V I R P V I A D D
V T C S A S E P T V R I V G R X 21 G M X 22 V D V

R D D D F H D G N Q I Q L W P S K S N N D P N
 Q L W T I K R D X23 T I R S N G S C L T T Y G Y
 T A G V Y V M I F D C N T A V R E A T I W Q I
 W X24 N G T I I N P R S N L V L A A S S G I K G
 T T L T V Q T L D Y T L G Q G W L A G N D T A
 P R E V T I Y G F R D L C M E S N X25 G S V W V
 E T C X26 S S Q X27 N Q X28 X29 W A L Y G D G S I R
 P K Q N Q D Q C L T X30 G R D S V S T V I N I V
 S C S X31 X32 S X33 X34 Q R W V F T N E X35 A I L N
 L K X36 X37 X38 X39 X40 D V A Q A N P K L R R I I I
 Y P A T G K P N Q M W L P V X41

oder eines Fragmentes davon, umfassend den Schritt des Expressierens mit Hilfe eines eukaryontischen Vektors, der eine für das Mistellektin-Polypeptid oder ein Fragment davon kodierende Nukleinsäure mit der ursprünglich in Mistelzell-DNA gefundenen Nukleinsäuresequenz enthält, in einer Mistelzelle und/oder einer transgenen Mistelpflanze, wobei das Transkriptionsprodukt dieses Nukleinsäuremoleküls in Mistelzellen und/oder transgenen Mistelpflanzen durch posttranskriptionale und/oder posttranslationale Mechanismen modifiziert wird,

wobei X1 D oder E ist; X2 G oder Q ist; X3 I oder V ist; X4 L oder A ist; X5 DR ist oder fehlt; X6 N oder T ist; X7 P oder T ist; X8 D oder E ist; X9 S oder T ist; X10 F oder Y ist; X11 T oder A ist; X12 A oder Y ist; X13 Y oder D ist; X14 A oder E ist; X15 V oder M ist; X16 I oder F ist; X17 P oder S ist; X18 P oder T ist; X19 T oder S ist; X20 D oder S ist; X21 N oder S ist; X22 C oder R ist; X23 G oder N ist; X24 G oder D ist; X25 G oder Q ist; X26 V oder D ist; X27 Q oder K ist; X28 G ist oder fehlt; X29 R oder K ist; X30 C oder S

oder V ist; X31 A oder G ist; X32 G oder A ist; X33 S oder G ist; X34 G oder S ist; X35 G oder Y ist; X36 N oder S oder T oder K ist; X37 S oder G ist; X38 L oder P ist; X39 A oder M ist; X40 M oder V ist; X41 P oder F ist.

41. Verfahren nach Anspruch 40, wobei das Mistellektin-Polypeptid der Mistellektin-A-Kette oder einem Fragment davon entspricht und die folgende Sequenz oder ein Fragment davon umfaßt:

```

Y E R L R L R V T H Q T T G X1 E Y F R F I T L
L R D Y V S S G S F S N E I P L L R Q S T I P
V S D A Q R F V L V E L T N Q G X2 D S X3 T A A
I D V T N X4 Y V V A Y Q A G D Q S Y F L R D A
P R G A E T H L F T G T T R X5 S S L P F X6 G S
Y X7 D L E R Y A G H R D Q I P L G I X8 Q L I Q
S V X9 A L R X10 P G G S T R X11 Q A R S I L I L
I Q M I S E A A R F N P I L W R X12 R Q X13 I N
S G X14 S F L P D X15 Y M L E L E T S W G Q Q S
T Q V Q H S T D G V F N N P X16 R L A I X17 X18 G
N F V T L X19 N V R X20 V I A S L A I M L F V C
G E R P S S S

```

wobei X1 bis X20 die oben angegebene Bedeutung haben.

42. Verfahren nach Anspruch 40, wobei das Mistellektin-Polypeptid der Mistellektin-B-Kette oder einem Fragment davon entspricht und die folgende Sequenz oder ein Fragment davon umfaßt:

D D V T C S A S E P T V R I V G R X21 G M X22 V D
V R D D D F H D G N Q I Q L W P S K S N N D P N
Q L W T I K R D X23 T I R S N G S C L T T Y G Y
T A G V Y V M I F D C N T A V R E A T I W Q I W
X24 N G T I I N P R S N L V L A A S S G I K G T T
L T V Q T L D Y T L G Q G W L A G N D T A P R E
V T I Y G F R D L C M E S N X25 G S V W V E T C
X26 S S Q X27 N Q X28 X29 W A L Y G D G S I R P K Q N
Q D Q C L T X30 G R D S V S T V I N I V S C S X31
X32 S X33 X34 Q R W V F T N E X35 A I L N L K X36 X37
X38 X39 X40 D V A Q A N P K L R R I I I Y P A T G
K P N Q M W L P V X41

wobei X21 bis X41 die oben angegebene Bedeutung haben.

43. Verfahren zum Bereitstellen eines Nukleinsäuremoleküls, das in einer Mistelzelle und/oder einer transgenen Mistelpflanze für ein Mistellektin-Polypeptid nach Anspruch 4 kodiert, umfassend die Schritte:

- a) Präparieren von Mistelzell-RNA oder chromosomaler Mistelzell-DNA und

- b) Amplifizieren von Mistelzell-RNA oder chromosomaler Mistellektin-DNA durch PCR unter Verwendung von Oligonukleotiden, die von dem in Abb.1b dargestellten Mistellektin-Polypeptid abgeleitet sind, und
- c) gegebenenfalls Identifizieren von Sequenzen, die 5' und 3' von der amplifizierten Nukleinsäure liegen sowie deren Amplifikation, und
- d) Isolieren der in Schritt b) und/oder c) amplifizierten Nukleinsäuremoleküle, und
- e) gegebenenfalls Ligieren mehrerer der in Schritt b) und/oder c) isolierten Nukleinsäuremoleküle, so daß ein Nukleinsäuremolekül mit vollständigem offenen Leseraster erhalten wird, und
- f) gegebenenfalls gezieltes Mutieren des erhaltenen Nukleinsäuremoleküls, um das Nukleinsäuremolekül dem üblichen genetischen Code für eine der in Mistelzellen identifizierten Mistellektin-Polypeptidisoformen anzupassen und/oder die Expression zu optimieren.

44. Verfahren zum Herstellen eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder 40 bis 42, umfassend als weiteren Schritt das Modifizieren von Zuckerseitenketten durch enzymatisches und/oder chemisches Ergänzen, Entfernen und/oder Ändern einer oder mehrerer Seitenketten.

45. Verfahren nach Anspruch 44, wobei das Ergänzen, Entfernen und/oder Ändern der Zuckerseitenketten zur Angleichung an die natürlichen Proteine führt.

Zusammenfassung

Rekombinante Mistellektine

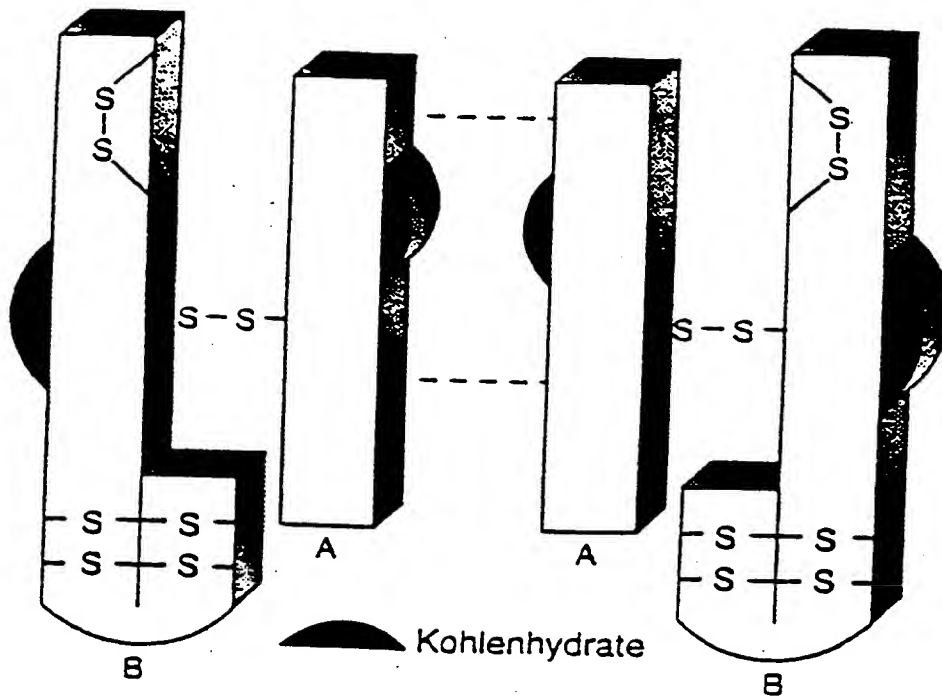
Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zum Herstellen von Mistellektin-Polypeptiden in homologen und heterologen Wirtssystemen sowie Mistellektin-Peptide als solche. Weiter werden Nukleinsäuremoleküle zur Verfügung gestellt, die für diese Mistellektin-Polypeptide kodieren, sowie pharmazeutische Zusammensetzungen, die diese Mistellektin-Polypeptide oder Mistellektin-Nukleinsäuren umfassen.

Um die zahlreichen, im natürlichen Misteleextrakt enthaltenen Mistellektin-Isoenzyme, die anti-tumorigene und stimmungsaufhellende Effekte auslösen können, in ausreichenden Mengen herzustellen, stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Verfügung, das es erlaubt, Mistellektine in erforderlichen Mengen biotechnologisch herzustellen und gleichzeitig die Diversität an Mistellektin-Isoenzymen des natürlichen Misteleextraktes nachzuempfinden.

14 05.03.99

Dimer

Monomer



Mistellektin I

TACGAGAGGCTAAGACTCAGAGTTACGCATCAAACCACGGGCGAGGAATACTTCCGGTTCATC
ACGCTTCTCCGAGATTATGTCTCAAGCGGAAGCTTTTCCAATGAGATACCACTCTTGCGTCAG
TCTACGATCCCCGTCTCCGATGCGCAAAGATTTGTCTTGGTGGAGCTCACCAACCAGGGGGGA
GACTCGATCACGGCCGCCATCGACGTTACCAATCTGTACGTCGTGGCTTACCAAGCAGGCGAC
CAATCCTACTTTTTGCGCGACGCACCACGCGGCGCGGAAACGCACCTCTTCACCGGCACCACC
CGATCCTCTCTCCCATTTCAACGGAAGCTACCCTGATCTGGAGCGATACGCCGGACATAGGGAC
CAGATCCCTCTCGGTATAGACCAACTCATTCAATCCGTCACGGCGCTTCGTTTTCCGGGCGGC
AGCACGCGTACCCAAGCTCGTTTCGATTTTAATCCTCATTAGATGATCTCCGAGGCCGCCAGA
TTCAATCCCATCTTATGGAGGGCTCGCCAATACATTAACAGTGGGGCGTCATTTCTGCCAGAC
GTGTACATGCTGGAGCTGGAGACGAGTTGGGGCCAACAATCCACGCAAGTCCAGCATTCAACC
GATGGCGTTTTTTAATAACCCAATTCGGTTGGCTATACCCCCGGTAAC TTCGTGACGTTGACC
AATGTTTCGCGACGTGATCGCCAGCTTGCGGATCATGTTGTTTGTATGCGGAGAGCGGCCATCT
TCCTCTGACGTGCGCTATTGGCCGCTGGTCATACGACCCGTGATAGCCGATGATGTTACCTGC
AGTGCTTCGGAACCTACGGTGCGGATTGTGGGTGCGAAATGGCATGTGCGTGGACGTCCGAGAT
GACGATTTCCACGATGGGAATCAGATACAGTTGTGGCCCTCCAAGTCCAACAATGATCCGAAT
CAGTTGTGGACGATCAAAGGGATGGAACCATTCGATCCAATGGCAGCTGCTTGACCACGTAT
GGCTATACTGCTGGCGTCTATGTGATGATCTTCGACTGTAATACTGCTGTGCGGGAGGCCACT
ATTTGGCAGATATGGGGCAATGGGACCATCATCAATCCAAGATCCAATCTGGTTTTGGCAGCA
TCATCTGGAATCAAAGGCACTACGCTTACGGTGCAAACACTGGATTACACGTTGGGACAGGGC
TGGCTTGCCGGTAATGATACCGCCCCACGCGAGGTGACCATATATGGTTTCAGGGACCTTTGC
ATGGAATCAAATGGAGGGAGTGTGTGGGTGGAGACGTGCGTGAGTAGCCAACAGAACCAAGA
TGGGCTTTGTACGGGGATGGTTCATACGCCCCAAACAAAACCAAGACCAATGCCTCACCTGT
GGGAGAGACTCCGTTTCAACAGTAATCAATATAGTTAGCTGCAGCGCTGGATCGTCTGGGCAG
CGATGGGTGTTTACCAATGAAGGGGCCATTTTGAATTTAAAGAATGGGTTGGCCATGGATGTG

4105.17.00
GCGCAAGCAAATCCAAAGCTCCGCCGAATAATTATCTATCCTGCCACAGGAAAACCAAATCAA
ATGTGGCTTCCCGTGCCATGA

Abb. 1b

Mistellektin I

Y E R L R L R V T H Q T T G E E Y F R F I
T L L R D Y V S S G S F S N E I P L L R Q
S T I P V S D A Q R F V L V E L T N Q G G
D S I T A A I D V T N L Y V V A Y Q A G D
Q S Y F L R D A P R G A E T H L F T G T T
R S S L P F N G S Y P D L E R Y A G H R D
Q I P L G I D Q L I Q S V T A L R F P G G
S T R T Q A R S I L I L I Q M I S E A A R
F N P I L W R A R Q Y I N S G A S F L P D
V Y M L E L E T S W G Q Q S T Q V Q H S T
D G V F N N P I R L A I P P G N F V T L T
N V R D V I A S L A I M L F V C G E R P S
S S D V R Y W P L V I R P V I A D D V T C
S A S E P T V R I V G R N G M C V D V R D
D D F H D G N Q I Q L W P S K S N N D P N
Q L W T I K R D G T I R S N G S C L T T Y
G Y T A G V Y V M I F D C N T A V R E A T
I W Q I W G N G T I I N P R S N L V L A A
S S G I K G T T L T V Q T L D Y T L G Q G
W L A G N D T A P R E V T I Y G F R D L C
M E S N G G S V W V E T C V S S Q Q N Q R
W A L Y G D G S I R P K Q N Q D Q C L T C
G R D S V S T V I N I V S C S A G S S G Q
R W V F T N E G A I L N L K N G L A M D V

A Q A N P K L R R I T T Y P A T G K P N Q
M W L P V P

1495.03.99
Abb. 2a

Mistellektin A1

TACGAGAGGCTAAGACTCAGAGTTACGCATCAAACCACGGGCGAGGAATACTTCCGGTTCATC
ACGCTTCTCCGAGATTATGTCTCAAGCGGAAGCTTTTCCAATGAGATACCACTCTTGCGTCAG
TCTACGATCCCCGTCTCCGATGCGCAAAGATTTGTCTTGGTGGAGCTCACCAACCAGGGGCAG
GACTCGGTTACGGCCGCCATCGACGTTACCAATGCTTACGTCGTGGCTTACCAAGCAGGCGAC
CAATCCTACTTTTTGCGCGACGCACCACGCGGCGCGGAAACGCACCTCTTCACCGGCACCACC
CGATCCTCTCTCCCATTTCAACGGAAGCTACCCTGATCTGGAGCGATACGCCGGACATAGGGAC
CAGATCCCTCTCGGTATAGACCAACTCATTCAATCCGTCACGGCGCTTCGTTTTCCGGGCGGC
AGCACGCGTACCCAAGCTCGTTCGATTTTAATCCTCATTGAGATGATCTCCGAGGCCGCCAGA
TTCAATCCCATCTTATGGAGGTACCGCCAATACATTAACAGTGGGGCGTCATTTCTGCCAGAC
GTGTACATGCTGGAGCTGGAGACGAGTTGGGGCCAACAATCCACGCAAGTCCAGCATTCAACC
GATGGCGTTTTTAATAACCCAATTCGGTTGGCTATACCCCCGGTAACTTCGTGACGTTGACC
AATGTTGCGGACGTGATCGCCAGCTTGCGGATCATGTTGTTGTATGCGGAGAGCGGCCATCT
TCCTCT

1405.03.99

Abb. 2b

Mistellektin A1

Y E R L R L R V T H Q T T G E E Y F R F I
T L L R D Y V S S G S F S N E I P L L R Q
S T I P V S D A Q R F V L V E L T N Q G Q
D S V T A A I D V T N A Y V V A Y Q A G D
Q S Y F L R D A P R G A E T H L F T G T T
R S S L P F N G S Y P D L E R Y A G H R D
Q I P L G I D Q L I Q S V T A L R F P G G
S T R T Q A R S I L I L I Q M I S E A A R
F N P I L W R Y R Q Y I N S G A S F L P D
V Y M L E L E T S W G Q Q S T Q V Q H S T
D G V F N N P I R L A I P P G N F V T L T
N V R D V I A S L A I M L F V C G E R P S
S S

11.05.03.99

ABB.3a

Mistellektin A2

TACGAGAGGCTAAGACTCAGAGTTACGCATCAAACCACGGGCGATGAATACTTCCGGTTCAT
CACGCTTCTCCGAGATTATGTCTCAAGCGGAAGCTTTTCCAATGAGATACCACTCTTGCGTC
AGTCTACGATCCCCGTCTCCGATGCGCAAAGATTTGTCTTGGTGGAGCTCACCAACCAGGGG
CAGGACTCGATCACGGCCGCCATCGACGTTACCAATGCTTACGTCGTGGCTTACCAAGCAGG
CGACCAATCCTACTTTTTGCGCGACGCACCACGCGGCGCGGAAACGCACCTCTTCACCGGCA
CCACCCGAGATAGATCCTCTCTCCCATTCACTGGAAGCTACACCGATCTGGAGCGATACGCC
GGACATAGGGACCAGATCCCTCTCGGTATAGAGCAACTCATTCAATCCGTCTCTGCGCTTCG
TTACCCGGGCGGCAGCACGCGTGCTCAAGCTCGTTGATTTTAATCCTCATTAGATGATCT
CCGAGGCCGCCAGATTCAATCCCATCTTATGGAGGTACCGCCAAGATATTAACAGTGGGGAA
TCATTTCTGCCAGACATGTACATGCTGGAGCTGGAGACGAGTTGGGGCCAACAATCCACGCA
AGTCCAGCATTCAACCGATGGCGTTTTTAATAACCCATTCCGGTTGGCTATATCTACTGGTA
ACTTCGTGACGTTGTCTAATGTTGCTCTGTGATCGCCAGCTTGGCGATCATGTTGTTTGTA
TGCGGAGAGCGGCCATCTTCCTCT

14050300

Abb. 3b

Mistellektin A2

Y E R L R L R V T H Q T T G D E Y F R F I
T L L R D Y V S S G S F S N E I P L L R Q
S T I P V S D A Q R F V L V E L T N Q G Q
D S I T A A I D V T N A Y V V A Y Q A G D
Q S Y F L R D A P R G A E T H L F T G T T
R D R S S L P F T G S Y T D L E R Y A G H
R D Q I P L G I E Q L I Q S V S A L R Y P
G G S T R A Q A R S I L I L I Q M I S E A
A R F N P I L W R Y R Q D I N S G E S F L
P D M Y M L E L E T S W G Q Q S T Q V Q H
S T D G V F N N P F R L A I S T G N F V T
L S N V R S V I A S L A I M L F V C G E R
P S S S

1405.00.00

Abb. 4a

Mistellektin I (angepaßt)

TATGAAAGATTGAGGTTGAGGGTGACTCACCAGACTACAGGAGAAGAGTATTTTAGATTTATT
 ACTTTGTTGAGGGATTACGTTAGTTCTGGTTCCTTCAGTAACGAAATTCCTTTGCTTAGACAA
 TCTACTATTCCAGTTTCTGATGCTCAGCGTTTCGTTCTTGTTGAATTGACTAACCAAGGAGGT
 GATAGTATTACTGCTGCTATTGATGTGACTAACCTTTATGTTGTTGCATATCAGGCTGGTGAT
 CAGTCTTATTTCCCTTAGGGATGCTCCTAGAGGAGCTGAGACTCATTGTGTTACTGGTACAACA
 CGGAGTTCTTTGCCTTTTAACGGTTCTTATCCAGACTTGGAAGATATGCTGGTCACAGAGAT
 CAAATTCCATTGGAATTGATCAGTTGATCCAGAGTGTTACTGCTTTGAGATTCACAGGTGGA
 TCTACTAGAACACAGGCAAGATCTATCCTTATTTTGATCCAAATGATTAGTGAAGCTGCTAGG
 TTTAACCTTATTCTTTGGAGAGCAAGACAGTATATCAACTCTGGTGCTTCTTTCCTTCCTGAT
 GTTTATATGCTTGAACCTTGAACTTCATGGGGACAGCAGTCTACTCAGGTTCAACACAGTACA
 GACGGTGTGTTCAACAATCCTATCAGACTTGCAATTCCACCTGGAAATTTTGTTACTCTTACA
 AACGTCAGAGATGTTATTGCTTCTCTTGCTATTATGCTTTTCGTTTGTGGTGAAAGACCTTCT
 AGTTCTGATGTTAGATACTGGCCATTGGTTATTAGGCCTGTTATCGCTGACGATGTGACATGT
 TCTGCATCTGAACCAACTGTTAGGATCGTTGGAAGAAACGGTATGTGTGTTGATGTTCTGGGAC
 GATGACTTTTCATGACGGTAACCAAATCCAACCTTGGCCTAGTAAGTCTAATAACGACCCAAAC
 CAACTTTGGACTATTAAGAGAGACGGTACAATCAGGTCTAACGGATCTTGTCTTACTACATAC
 GGTACACTGCAGGAGTTTACGTTATGATTTTTTGATTGCAACACAGCAGTTAGAGAAGCTACA
 ATCTGGCAAATCTGGGGTAACGGAACATTATTAACCCTCGTTCTAACTTGGTGCTTGCTGCT
 TCTAGTGGTATTAAGGGAACAACCTTGACTGTTTCAGACTTTGGACTATACTCTTGGTCAAGGA
 TGGTTGGCTGGAAACGACACAGCTCCTAGAGAAGTTACAATCTACGGATTTAGAGATTTGTGT
 ATGGAGTCTAACGGTGGATCTGTTTGGGTGAAACTTGTGTTTCATCTCAGCAAAATCAGAGG
 TGGGCACTTTATGGTGACGGAAGTATCAGACCTAAGCAGAATCAGGATCAGTGTTTGACATGC
 GGTTAGGGATAGTGTGTCTACTGTTATTAACATTGTGTCTTGTCTGTCAGGTAGTTCTGGACAA
 AGGTGGGTTTTACAAACGAGGGTGCTATCCTTAACTTGAAGAACGGTCTTGCTATGGATGTT

14.05.03.00

GCTCAGGCTAACCCTAAGTTGAGAAGGATTATCTTTACCCAGCTACTGGTAAGCCTAACCAG
ATGTGGTTGCCAGTTCCTTAT

1405.03.99
Abb. 4b.

Mistellektin I (angepaßt)

Y E R L R L R V T H Q T T G E E Y F R F I
T L L R D Y V S S G S F S N E I P L L R Q
S T I P V S D A Q R F V L V E L T N Q G G
D S I T A A I D V T N L Y V V A Y Q A G D
Q S Y F L R D A P R G A E T H L F T G T T
R S S L P F N G S Y P D L E R Y A G H R D
Q I P L G I D Q L I Q S V T A L R F P G G
S T R T Q A R S I L I L I Q M I S E A A R
F N P I L W R A R Q Y I N S G A S F L P D
V Y M L E L E T S W G Q Q S T Q V Q H S T
D G V F N N P I R L A I P P G N F V T L T

N V R D V I A S L A I M L F V C G E R P S
S S D V R Y W P L V I R P V I A D D V T C
S A S E P T V R I V G R N G M C V D V R D
D D F H D G N Q I Q L W P S K S N N D P N
Q L W T I K R D G T I R S N G S C L T T Y
G Y T A G V Y V M I F D C N T A V R E A T
I W Q I W G N G T I I N P R S N L V L A A
S S G I K G T T L T V Q T L D Y T L G Q G
W L A G N D T A P R E V T I Y G F R D L C
M E S N G G S V W V E T C V S S Q Q N Q R
W A L Y G D G S I R P K Q N Q D Q C L T C
G R D S V S T V I N I V S C S A G S S G Q
R W V F T N E G A I L N L K N G L A M D V

14 05.03.99
A Q A N P K L R R I I T Y P A T G K P N Q
M W L P V P

1405.03.99

Abb. 5a

Mistellektin A1 (angepaßt)

TATGAAAGATTGAGGTTGAGGGTGACTCACCAGACTACAGGAGAAGAGTATTTTAGATTTATT
ACTTTGTTGAGGGATTACGTTAGTTCTGGTTCTTTCAGTAACGAAATTCCTTTGCTTAGACAA
TCTACTATTCCAGTTTCTGATGCTCAGCGTTTCGTTCTTGTTGAATTGACTAACCAAGGACAG
GATAGTGTTACTGCTGCTATTGATGTGACTAACGCTTATGTTGTTGCATATCAGGCTGGTGAT
CAGTCTTATTTCCCTTAGGGATGCTCCTAGAGGAGCTGAGACTCATTGTGTTACTGGTACAACA
CGGAGTTCTTTGCCTTTTAACGGTTCTTATCCAGACTTGGAAGATATGCTGGTCACAGAGAT
CAAATTCATTGGGAATTGATCAGTTGATCCAGAGTGTTACTGCTTTGAGATCCCAGGTGGA
TCTACTAGAACACAGGCAAGATCTATCCTTATTTTGATCCAAATGATTAGTGAAGCTGCTAGG
TTTAACCCTATTCTTTGGAGATACAGACAGTATATCAACTCTGGTGCTTCTTTCCTTCCTGAT
GTTTATATGCTTGAACCTTGAACTTCATGGGGACAGCAGTCTACTCAGGTTCAACACAGTACA
GACGGTGTGTTCAACAATCCTATCAGACTTGCAATTCCACCTGGAAATTTTGTTACTCTTACA
~~AACGTGAGAGATGTTATTGCTTCTCTTGCTATTATGCTTTTCGTTTGTGGTGAAAGACCTTCT~~
AGTTCT

Mistellektin A1 (angepaßt)

Y E R L R L R V T H Q T T G E E Y F R F I
T L L R D Y V S S G S F S N E I P L L R Q
S T I P V S D A Q R F V L V E L T N Q G Q
D S V T A A I D V T N A Y V V A Y Q A G D
Q S Y F L R D A P R G A E T H L F T G T T
R S S L P F N G S Y P D L E R Y A G H R D
Q I P L G I D Q L I Q S V T A L R F P G G
S T R T Q A R S I L I L I Q M I S E A A R
F N P I L W R Y R Q Y I N S G A S F L P D
V Y M L E L E T S W G Q Q S T Q V Q H S T
D G V F N N P I R L A I P P G N F V T L T
N V R D V I A S L A I M L F V C G E R P S
S S

105.03.99

Abb. 6a

Mistellektin A2 (angepaßt)

TATGAAAGATTGAGGTTGAGGGTGACTCACCAGACTACAGGAGATGAGTATTTAGATTTATT
ACTTTGTTGAGGGATTACGTTAGTTCTGGTTCTTTCAGTAACGAAATTCCTTTGCTTAGACAA
TCTACTATTCCAGTTTCTGATGCTCAGCGTTTCGTTCTTGTTGAATTGACTAACCAAGGACAG
GATAGTATTACTGCTGCTATTGATGTGACTAACGCTTATGTTGTTGCATATCAGGCTGGTGAT
CAGTCTTATTTCTTAGGGATGCTCCTAGAGGAGCTGAGACTCATTGTGTTTACTGGTACAACA
CGGGATAGAAGTTCTTTGCCTTTTACTGGTTCTTATACAGACTTGGAAGATATGCTGGTCAC
AGAGATCAAATTCCATTGGGAATTGAGCAGTTGATCCAGAGTGTTTCTGCTTTGAGATACCCA
GGTGGATCTACTAGAGCTCAGGCAAGATCTATCCTTATTTTGATCCAAATGATTAGTGAAGCT
GCTAGGTTTAACCCTATTCTTTGGAGATACAGACAGGATATCAACTCTGGTGAATCTTTCCTT
CCTGATATGTATATGCTTGAACTTGAACTTCATGGGGACAGCAGTCTACTCAGGTTCAACAC
AGTACAGACGGTGTGTTCAACAATCCTTTCAGACTTGCAATTTCTACTGGAAATTTTGTTACT
CTTCTAACGTGAGATCTGTTATTGCTTCTCTTGCTATTATGCTTTTCGTTTGTGGTGAAAGA
CCTTCTAGTTCT

1050399
Abb. 6b.

Mistellektin A2 (angepaßt)

Y E R L R L R V T H Q T T G D E Y F R F I
T L L R D Y V S S G S F S N E I P L L R Q
S T I P V S D A Q R F V L V E L T N Q G Q
D S I T A A I D V T N A Y V V A Y Q A G D
Q S Y F L R D A P R G A E T H L F T G T T
R D R S S L P F T G S Y T D L E R Y A G H
R D Q I P L G I E Q L I Q S V S A L R Y P
G G S T R A Q A R S I L I L I Q M I S E A
A R F N P I L W R Y R Q D I N S G E S F L
P D M Y M L E L E T S W G Q Q S T Q V Q H
S T D G V F N N P F R L A I S T G N F V T
L S N V R S V I A S L A I M L F V C G E R
P S S S

Mistellektin B

GATGATGTTACCTGCAGTGCTTCGGAACCTACGGTGCGGATTGTGGGTCGAAATGGCATGTGC
GTGGACGTCCGAGATGACGATTTCCACGATGGGAATCAGATACAGTTGTGGCCCTCCAAGTCC
AACAAATGATCCGAATCAGTTGTGGACGATCAAAGGGATGGAACCATTGATCCAATGGCAGC
TGCTTGACCACGTATGGCTATACTGCTGGCGTCTATGTGATGATCTTCGACTGTAATACTGCT
GTGCGGGAGGCCACTATTTGGCAGATATGGGGCAATGGGACCATCATCAATCCAAGATCCAAT
CTGGTTTTGGCAGCATCATCTGGAATCAAAGGCACCTACGCTTACGGTGCAAACACTGGATTAC
ACGTTGGGACAGGGCTGGCTTGCCGGTAATGATACCGCCCCACGCGAGGTGACCATATATGGT
TTCAGGGACCTTTGCATGGAATCAAATGGAGGGAGTGTGTGGGTGGAGACGTGCGTGAGTAGC
CAACAGAACCAGATGGGCTTTGTACGGGGATGGTTCTATACGCCCCAAACAAAACCAAGAC
CAATGCCTCACCTGTGGGAGAGACTCCGTTTCAACAGTAATCAATATAGTTAGCTGCAGCGCT
GGATCGTCTGGGCAGCGATGGGTGTTTACCAATGAAGGGGCCATTTTGAATTTAAAGAATGGG
TTGGCCATGGATGTGGCGCAAGCAAATCCAAAGCTCCGCCGAATAATTATCTATCCTGCCACA
GGAAAACCAAATCAAATGTGGCTTCCCGTGCCATGA

Mistellektin B

D D V T C S A S E P T V R I V G R N G M C
 V D V R D D D F H D G N Q I Q L W P S K S
 N N D P N Q L W T I K R D G T I R S N G S
 C L T T Y G Y T A G V Y V M I F D C N T A
 V R E A T I W Q I W G N G T I I N P R S N
 L V L A A S S G I K G T T L T V Q T L D Y
 T L G Q G W L A G N D T A P R E V T I Y G
 F R D L C M E S N G G S V W V E T C V S S
 Q Q N Q R W A L Y G D G S I R P K Q N Q D
 Q C L T C G R D S V S T V I N I V S C S A
 G S S G Q R W V F T N E G A I L N L K N G
 L A M D V A Q A N P K L R R I I I Y P A T
 G K P N Q M W L P V P

Abb. 8a

050000

Mistellektin B1

GATGATGTTACCTGCAGTGCTTCGGAACCTACGGTGCGGATTGTGGGTCGAAATGGCATGCGC
GTGGACGTCCGAGATGACGATTTCCACGATGGGAATCAGATACAGTTGTGGCCCTCCAAGTCC
AACAAATGATCCGAATCAGTTGTGGACGATCAAAGGGATGGAACCATTTCGATCCAATGGCAGC
TGCTTGACCACGTATGGCTATACTGCTGGCGTCTATGTGATGATCTTCGACTGTAATACTGCT
GTGCGGGAGGCCACTATTTGGCAGATATGGGACAATGGGACCATCATCAATCCAAGATCCAAT
CTGGTTTTTGGCAGCATCATCTGGAATCAAAGGCACCTACGCTTACGGTGCAAACACTGGATTAC
ACGTTGGGACAGGGCTGGCTTGCCGGTAATGATACCGCCCCACGCGAGGTGACCATATATGGT
TTCAGGGACCTTTGCATGGAATCAAATGGAGGGAGTGTGTGGGTGGAGACGTGCGACAGTAGC
CAAAAGAACCAAGGCAAATGGGCTTTGTACGGGGATGGTTCTATACGCCCCAAACAAAACCAA
GACCAATGCCTCACCTCTGGGAGAGACTCCGTTTCAACAGTAATCAATATAGTTAGCTGCAGC
GGAGCTTCGGGGTCTCAGCGATGGGTGTTTACCAATGAAGGGGCCATTTTGAATTTAAAGAAT
GGGTTGGCCATGGATGTGGCGCAAGCAAATCCAAAGCTCCGCCGAATAATTATCTATCCTGCC
ACAGGAAAACCAAATCAAATGTGGCTTCCCGTGTTCTGA

Mistellektin B1

D D V T C S A S E P T V R I V G R N G M R
V D V R D D D F H D G N Q I Q L W P S K S
N N D P N Q L W T I K R D G T I R S N G S
C L T T Y G Y T A G V Y V M I F D C N T A
V R E A T I W Q I W D N G T I I N P R S N
L V L A A S S G I K G T T L T V Q T L D Y
T L G Q G W L A G N D T A P R E V T I Y G
F R D L C M E S N G G S V W V E T C D S S
Q K N Q G K W A L Y G D G S I R P K Q N Q
D Q C L T S G R D S V S T V I N I V S C S
G A S G S Q R W V F T N E G A I L N L K N
G L A M D V A Q A N P K L R R I I I Y P A
T G K P N Q M W L P V F

Abb. 9a

05.03.99

Mistellektin B2

GATGATGTTACCTGCAGTGCTTCGGAACCTACGGTGCGGATTGTGGGTGGAAGTGGCATGCGC
GTGGACGTCCGAGATGACGATTTCCACGATGGGAATCAGATACAGTTGTGGCCCTCCAAGTCC
AACAAATGATCCGAATCAGTTGTGGACGATCAAAGGGATAACACCATTCGATCCAATGGCAGC
TGCTTGACCACGTATGGCTATACTGCTGGCGTCTATGTGATGATCTTCGACTGTAATACTGCT
GTGCGGGAGGCCACTATTTGGCAGATATGGGACAATGGGACCATCATCAATCCAAGATCCAAT
CTGGTTTTTGGCAGCATCATCTGGAATCAAAGGCACTACGCTTACGGTGCAAACACTGGATTAC
ACGTTGGGACAGGGCTGGCTTGCCGGTAATGATACCGCCCCACGCGAGGTGACCATATATGGT
TTCAGGGACCTTTGCATGGAATCAAATCAAGGGAGTGTGTGGGTGGAGACGTGCGACAGTAGC
CAAAGAACCAAGGCAAATGGGCTTTGTACGGGGATGGTTCATACGCCCCAAACAAAACCAA
GACCAATGCCTCACCGTTGGGAGAGACTCCGTTTCAACAGTAATCAATATAGTTAGCTGCAGC
GGAGCTTCGGGGTCTCAGCGATGGGTGTTTACCAATGAATACGCCATTTTGAATTTAAAGAGT
GGGTTGCCCATCGATCTGGGGCAAGCAAATCCAAAGCTCCGCCGAATAATTATCTATCCTGCC
ACAGGAAAACCAAATCAAATGTGGCTTCCCGTGTTCTGA

Mistellektin B2

D D V T C S A S E P T V R I V G R S G M R
 V D V R D D D F H D G N Q I Q L W P S K S
 N N D P N Q L W T I K R D N T I R S N G S
 C L T T Y G Y T A G V Y V M I F D C N T A
 V R E A T I W Q I W D N G T I I N P R S N
 L V L A A S S G I K G T T L T V Q T L D Y
 T L G Q G W L A G N D T A P R E V T I Y G
 F R D L C M E S N Q G S V W V E T C D S S
 Q K N Q G K W A L Y G D G S I R P K Q N Q
 D Q C L T V G R D S V S T V I N I V S C S
 G A S G S Q R W V F T N E Y A I L N L K S
 G L A M D V A Q A N P K L R R I I I Y P A
 T G K P N Q M W L P V F

Mistellektin B3

GATGATGTTACCTGCAGTGCTTCGGAACCTACGGTGCGGATTGTGGGTCGAAATGGCATGCGC
GTGGACGTCCGAGATGACGATTTCCACGATGGGAATCAGATACAGTTGTGGCCCTCCAAGTCC
AACAAATGATCCGAATCAGTTGTGGACGATCAAAGGGATGGAACCATTCGATCCAATGGCAGC
TGCTTGACCACGTATGGCTATACTGCTGGCGTCTATGTGATGATCTTCGACTGTAATACTGCT
GTGCGGGAGGCCACTATTTGGCAGATATGGGACAATGGGACCATCATCAATCCAAGATCCAAT
CTGGTTTTTGGCAGCATCATCTGGAATCAAAGGCACTACGCTTACGGTGCAAACACTGGATTAC
ACGTTGGGACAGGGCTGGCTTGCCGGTAATGATACCGCCCCACGCGAGGTGACCATATATGGT
TTCAGGGACCTTTGCATGGAATCAAATGGAGGGAGTGTGTGGGTGGAGACGTGCGACAGTAGC
CAAAGAACCAAGGCAAATGGGCTTTGTACGGGGATGGTTCTATACGCCCCAAACAAAACCAA
GACCAATGCCTCACCTCTGGGAGAGACTCCGTTTCAACAGTAATCAATATAGTTAGCTGCAGC
GGAGCTTCGGGGTCTCAGCGATGGGTGTTTACCAATGAAGGGGCCATTTTGAATTTAAAGACT
GGGTGGCCATGCATGTGCGCGAAGCAAATGCAAGCTGCGCGAATAATTATCTATCCTGCC
ACAGGAAAACCAAATCAAATGTGGCTTCCCGTGTTCTGA

Mistellektin B3

D D V T C S A S E P T V R I V G R N G M R
V D V R D D D F H D G N Q I Q L W P S K S
N N D P N Q L W T I K R D G T I R S N G S
C L T T Y G Y T A G V Y V M I F D C N T A
V R E A T I W Q I W D N G T I I N P R S N
L V L A A S S G I K G T T L T V Q T L D Y
T L G Q G W L A G N D T A P R E V T I Y G
F R D L C M E S N G G S V W V E T C D S S
Q K N Q G K W A L Y G D G S I R P K Q N Q
D Q C L T S G R D S V S T V I N I V S C S
G A S G S Q R W V F T N E G A I L N L K T
G L A M D V A Q A N P K L R R I I I Y P A
T G K P N Q M W L P V F

Abb. 11a

050099

Mistellektin B4

GATGATGTTACCTGCAGTGCTTCGGAACCTACGGTGCGGATTGTGGGTGCGAAATGGCATGCGC
GTGGACGTCCGAGATGACGATTTCCACGATGGGAATCAGATACAGTTGTGGCCCTCCAAGTCC
AACAAATGATCCGAATCAGTTGTGGACGATCAAAGGGATGGAACCATTCGATCCAATGGCAGC
TGCTTGACCACGTATGGCTATACTGCTGGCGTCTATGTGATGATCTTCGACTGTAATACTGCT
GTGCGGGAGGCCACTATTTGGCAGATATGGGACAATGGGACCATCATCAATCCAAGATCCAAT
CTGGTTTTTGGCAGCATCATCTGGAATCAAAGGCACTACGCTTACGGTGCAAACACTGGATTAC
ACGTTGGGACAGGGCTGGCTTGCCGGTAATGATACCGCCCCACGCGAGGTGACCATATATGGT
TTCAGGGACCTTTGCATGGAATCAAATGGAGGGAGTGTGTGGGTGGAGACGTGCGACAGTAGC
CAAAAGAACCAAGGCAAATGGGCTTTGTACGGGGATGGTTCTATACGCCCCAAACAAAACCAA
GACCAATGCCTCACCTCTGGGAGAGACTCCGTTTCAACAGTAATCAATATAGTTAGCTGCAGC
GGAGCTTCGGGGTCTCAGCGATGGGTGTTTACCAATGAAGGGGCCATTTTGAATTTAAAGAAA
CGCCCCCGCATCGATGTGGGCGAAGCAAATCCAAAGCTCCGCGGAATAATTATCTATCCTGCC
ACAGGAAAACCAAATCAAATGTGGCTTCCCGTGTTCTGA

Mistellektin B4

D D V T C S A S E P T V R I V G R N G M R
V D V R D D D F H D G N Q I Q L W P S K S
N N D P N Q L W T I K R D G T I R S N G S
C L T T Y G Y T A G V Y V M I F D C N T A
V R E A T I W Q I W D N G T I I N P R S N
L V L A A S S G I K G T T L T V Q T L D Y
T L G Q G W L A G N D T A P R E V T I Y G
F R D L C M E S N G G S V W V E T C D S S
Q K N Q G K W A L Y G D G S I R P K Q N Q
D Q C L T S G R D S V S T V I N I V S C S
G A S G S Q R W V F T N E G A I L N L K K
G P A M D V A Q A N P K L R R I I I Y P A
T G K P N Q M W L P V F

Mistellektin B5

GATGATGTTACCTGCAGTGCTTCGGAACCTACGGTGCGGATTGTGGGTCGAAATGGCATGCGC
GTGGACGTCCGAGATGACGATTTCCACGATGGGAATCAGATACAGTTGTGGCCCTCCAAGTCC
AACAAATGATCCGAATCAGTTGTGGACGATCAAAGGGATGGAACCATTTCGATCCAATGGCAGC
TGCTTGACCACGTATGGCTATACTGCTGGCGTCTATGTGATGATCTTCGACTGTAATACTGCT
GTGCGGGAGGCCACTATTTGGCAGATATGGGACAATGGGACCATCATCAATCCAAGATCCAAT
CTGGTTTTTGGCAGCATCATCTGGAATCAAAGGCACTACGCTTACGGTGCAAACACTGGATTAC
ACGTTGGGACAGGGCTGGCTTGCCGGTAATGATACCGCCCCACGCGAGGTGACCATATATGGT
TTCAGGGACCTTTGCATGGAATCAAATGGAGGGAGTGTGTGGGTGGAGACGTGCGACAGTAGC
CAAAAGAACCAAGGCAAATGGGCTTTGTACGGGGATGGTTCTATACGCCCCAAACAAAACCAA
GACCAATGCCTCACCTCTGGGAGAGACTCCGTTTCAACAGTAATCAATATAGTTAGCTGCAGC
GGAGCTTCGGGGTCTCAGCGATGGGTGTTTACCAATGAAGGGGCCATTTTGAATTTAAAGAAT
AGCTTGATGGTGGATGTGGCGCAAGCAAATCCAAAGCTCCGCCGAATAATTATCTATCCTGCC
ACAGGAAAACCAAATCAAATGTGGCTTCCCGTGTTCTGA

Mistellektin B5

D D V T C S A S E P T V R I V G R N G M R
V D V R D D D F H D G N Q I Q L W P S K S
N N D P N Q L W T I K R D G T I R S N G S
C L T T Y G Y T A G V Y V M I F D C N T A
V R E A T I W Q I W D N G T I I N P R S N
L V L A A S S G I K G T T L T V Q T L D Y
T L G Q G W L A G N D T A P R E V T I Y G
F R D L C M E S N G G S V W V E T C D S S
Q K N Q G K W A L Y G D G S I R P K Q N Q
D Q C L T S G R D S V S T V I N I V S C S
G A S G S Q R W V F T N E G A I L N L K N
S L M V D V A Q A N P K L R R I I I Y P A
T G K P N Q M W L P V F

Mistellektin B (angepaßt)

GACGATGTGACATGTTCTGCATCTGAACCAACTGTTAGGATCGTTGGAAGAAACGGTATGTGT
GTTGATGTTTCGGGACGATGACTTTCATGACGGTAACCAAATCCAACCTTGGCCTAGTAAGTCT
AATAACGACCCAAACCAACTTTGGACTATTAAGAGAGACGGTACAATCAGGTCTAACGGATCT
TGTCTTACTACATACGGTTACACTGCAGGAGTTTACGTTATGATTTTTGATTGCAACACAGCA
GTTAGAGAAGCTACAATCTGGCAAATCTGGGGTAACGGAAC TATTATTAACCCTCGTTC TAAC
TTGGTGCTTGCTGCTTCTAGTG GTATTAAGGGAACAAC TTTGACTGTT CAGACTTTGGACTAT
ACTCTTGGTCAAGGATGGTTGGCTGGAAACGACACAGCTCCTAGAGAAGTTACAATCTACGGA
TTTAGAGATTTGTGTATGGAGTCTAACGGTGGATCTGTTTGGGTGAAACTTGTGTTTCATCT
CAGCAAAATCAGAGGTGGGCACTTTATGGTGACGGAAGTATCAGACCTAAGCAGAATCAGGAT
CAGTGTTTGACATGCGGTAGGGATAGTGTGTCTACTGTTATTAACATTGTGTCTTGTTCTGCA
GGTAGTTCTGGACAAAGGTGGGTTTTCACAAACGAGGGTGCTATCCTTAAC TTGAAGAACGGT
CTTGCTATGGATGTTGCTCAGGCTAACCCTAAGTTGAGAAGGATTATCATT TACCCAGCTACT
GGTAAGCCTAACCAGATGTGGTTGCCAGTTCCTTAT

Mistellektin B (angepaßt)

D D V T C S A S E P T V R I V G R N G M C
V D V R D D D F H D G N Q I Q L W P S K S
N N D P N Q L W T I K R D G T I R S N G S
C L T T Y G Y T A G V Y V M I F D C N T A
V R E A T I W Q I W G N G T I I N P R S N
L V L A A S S G I K G T T L T V Q T L D Y
T L G Q G W L A G N D T A P R E V T I Y G
F R D L C M E S N G G S V W V E T C V S S
Q Q N Q R W A L Y G D G S I R P K Q N Q D
Q C L T C G R D S V S T V I N I V S C S A
G S S G Q R W V F T N E G A I L N L K N G
L A M D V A Q A N P K L R R I I I Y P A T
G K P N Q M W L P V P

Mistellektin B1 (angepaßt)

GACGATGTGACATGTTCTGCATCTGAACCAACTGTTAGGATCGTTGGAAGAAACGGTATGCGT
GTTGATGTTTCGGGACGATGACTTTCATGACGGTAACCAAATCCAACTTTGGCCTAGTAAGTCT
AATAACGACCCAAACCAACTTTGGACTATTAAGAGAGACGGTACAATCAGGTCTAACGGATCT
TGTCTTACTACATACGGTTACACTGCAGGAGTTTACGTTATGATTTTTGATTGCAACACAGCA
GTTAGAGAAGCTACAATCTGGCAAATCTGGGATAACGGAAC TATTATTAACCCTCGTTCTAAC
TTGGTGCTTGCTGCTTCTAGTGGTATTAAGGGAACAAC TTTGACTGTTTCAGACTTTGGACTAT
ACTCTTGGTCAAGGATGGTTGGCTGGAAACGACACAGCTCCTAGAGAAGTTACAATCTACGGA
TTTAGAGATTTGTGTATGGAGTCTAACGGTGGATCTGTTTGGGTTGAAACTTGTGATTCATCT
CAGAAAAATCAGGGCAAGTGGGCAC TTTATGGTGACGGAAGTATCAGACCTAAGCAGAATCAG
GATCAGTGTTTGACATCCGGTAGGGATAGTGTGTCTACTGTTATTAACATTGTGTCTTGTTCT
GGAGCTAGTGGATCTCAAAGGTGGGTTTTACAAACGAGGGTGCTATCCTTAAC TTGAAGAAC
GGTGCTTGCTATCGATGTTGCTCAGGCTAACGCTAAGTTGACAAGCATTATCATT TAGCCAGCT
ACTGGTAAGCCTAACCAGATGTGGTTGCCAGTTTTTTAT

Mistellektin B1 (angepaßt)

D D V T C S A S E P T V R I V G R N G M R
 V D V R D D D F H D G N Q I Q L W P S K S
 N N D P N Q L W T I K R D G T I R S N G S
 C L T T Y G Y T A G V Y V M I F D C N T A
 V R E A T I W Q I W D N G T I I N P R S N
 L V L A A S S G I K G T T L T V Q T L D Y
 T L G Q G W L A G N D T A P R E V T I Y G
 F R D L C M E S N G G S V W V E T C D S S
 Q K N Q G K W A L Y G D G S I R P K Q N Q
 D Q C L T S G R D S V S T V I N I V S C S
 G A S G S Q R W V F T N E G A I L N L K N
 G L A M D V A Q A N P K L R R I I I Y P A
 T G K P N Q M W L P V F

Mistellektin B2 (angepaßt)

GACGATGTGACATGTTCTGCATCTGAACCAACTGTTAGGATCGTTGGAAGAAGCGGTATGCGT
 GTTGATGTTTCGGGACGATGACTTTCATGACGGTAACCAAATCCAACTTTGGCCTAGTAAGTCT
 AATAACGACCCAAACCAACTTTGGACTATTAAGAGAGACAATACAATCAGGTCTAACGGATCT
 TGTCTTACTACATACGGTTACACTGCAGGAGTTTACGTTATGATTTTTGATTGCAACACAGCA
 GTTAGAGAAGCTACAATCTGGCAAATCTGGGATAACGGAAC TATTATTAACCCTCGTTCTAAC
 TTGGTGCTTGCTGCTTCTAGTGGTATTAAGGGAACAAC TTTGACTGTTTCAGACTTTGGACTAT
 ACTCTTGGTCAAGGATGGTTGGCTGGAAACGACACAGCTCCTAGAGAAGTTACAATCTACGGA
 TTTAGAGATTTGTGTATGGAGTCTAACCAGGGATCTGTTTGGGTTGAAACTTGTGATTCATCT
 CAGAAAAATCAGGGCAAGTGGGCAC TTTATGGTGACGGAAGTATCAGACCTAAGCAGAATCAG
 GATCAGTGTTTGACAGTCGGTAGGGATAGTGTGTCTACTGTTATTAACATTGTGTCTTGTTCT
 GGAGCTAGTGGATCTCAAAGGTGGGTTTTACAAACGAGTATGCTATCCTTAACTTGAAGTCC
 GGTCTTCCTATCGATCTTCCTCAGGCTAAGCCTAACTTCAGAAGCATTATCATTACCCAGCT
 ACTGGTAAGCCTAACCAGATGTGGTTGCCAGTTTTTTAT

Mistellektin B2 (angepaßt)

D D V T C S A S E P T V R I V G R S G M R
V D V R D D D F H D G N Q I Q L W P S K S
N N D P N Q L W T I K R D N T I R S N G S
C L T T Y G Y T A G V Y V M I F D C N T A
V R E A T I W Q I W D N G T I I N P R S N
L V L A A S S G I K G T T L T V Q T L D Y
T L G Q G W L A G N D T A P R E V T I Y G
F R D L C M E S N Q G S V W V E T C D S S
Q K N Q G K W A L Y G D G S I R P K Q N Q
D Q C L T V G R D S V S T V I N I V S C S
G A S G S Q R W V F T N E Y A I L N L K S
G L A M D V A Q A N P K L R R I I I Y P A
T G K P N Q M W L P V F

Mistellektin B3 (angepaßt)

GACGATGTGACATGTTCTGCATCTGAACCAACTGTTAGGATCGTTGGAAGAAACGGTATGCGT
GTTGATGTTCTGGGACGATGACTTTCATGACGGTAACCAAATCCAACTTTGGCCTAGTAAGTCT
AATAACGACCCAAACCAACTTTGGACTATTAAGAGAGACGGTACAATCAGGTCTAACGGATCT
TGTCTTACTACATACGGTTACACTGCAGGAGTTTACGTTATGATTTTTGATTGCAACACAGCA
GTTAGAGAAGCTACAATCTGGCAAATCTGGGATAACGGAAC TATTATTAACCCTCGTTCTAAC
TTGGTGCTTGCTGCTTCTAGTGGTATTAAGGGAACAAC TTTGACTGTTTCAGACTTTGGACTAT
ACTCTTGGTCAAGGATGGTTGGCTGGAAACGACACAGCTCCTAGAGAAGTTACAATCTACGGA
TTTAGAGATTTGTGTATGGAGTCTAACGGTGGATCTGTTTGGGTTGAAACTTGTGATTCATCT
CAGAAAAATCAGGGCAAGTGGGCAC TTTATGGTGACGGAAGTATCAGACCTAAGCAGAATCAG
GATCAGTGTTTGACATCCGGTAGGGATAGTGTGTCTACTGTTATTAACATTGTGTCTTGTTCT
GGAGCTAGTGGATCTCAAAGGTGGGTTTTACAAACGAGGGTGCTATCCTTAAC TTGAAGACC
GGTCTTGCTATGGATGTTGCTCAGGCTAACCCTAAGTTGAGAAGGATTATCATT TACCCAGCT

ACTGGTAAGCCTAACCAGATGTGGTTGCCAGTTTTTTAT

Mistellektin B3 (angepaßt)

D D V T C S A S E P T V R I V G R N G M R
V D V R D D D F H D G N Q I Q L W P S K S
N N D P N Q L W T I K R D G T I R S N G S
C L T T Y G Y T A G V Y V M I F D C N T A
V R E A T I W Q I W D N G T I I N P R S N
L V L A A S S G I K G T T L T V Q T L D Y
T L G Q G W L A G N D T A P R E V T I Y G
F R D L C M E S N G G S V W V E T C D S S
Q K N Q G K W A L Y G D G S I R P K Q N Q
D Q C L T S G R D S V S T V I N I V S C S
G A S G S Q R W V F T N E G A I L N L K T
G L A M D V A Q A N P K L R R I I I Y P A
T G K P N Q M W L P V F

Mistellektin B4 (angepaßt)

GACGATGTGACATGTTCTGCATCTGAACCAACTGTTAGGATCGTTGGAAGAAACGGTATGCGT
 GTTGATGTTTCGGGACGATGACTTTCATGACGGTAACCAAATCCAAC TTTGGCCTAGTAAGTCT
 AATAACGACCCAAACCAACTTTGGACTATTAAGAGAGACGGTACAATCAGGTCTAACGGATCT
 TGTCTTACTACATACGGTTACACTGCAGGAGTTTACGTTATGATTTTTGATTGCAACACAGCA
 GTTAGAGAAGCTACAATCTGGCAAATCTGGGATAACGGAAC TATTATTAACCCTCGTTCTAAC
 TTGGTGCTTGCTGCTTCTAGTGGTATTAAGGGAACAAC TTTGACTGTTTCAGACTTTGGACTAT
 ACTCTTGGTCAAGGATGGTTGGCTGGAAACGACACAGCTCCTAGAGAAGTTACAATCTACGGA
 TTTAGAGATTTGTGTATGGAGTCTAACGGTGGATCTGTTTGGGTGAAACTTGTGATTCATCT
 CAGAAAAATCAGGGCAAGTGGGCAC TTTATGGTGACGGAAGTATCAGACCTAAGCAGAATCAG
 GATCAGTGTTTGACATCCGGTAGGGATAGTGTGTCTACTGTTATTAACATTGTGTCTTGTTCT
 GGAGCTAGTGGATCTCAAAGGTGGGTTTTACAAACGAGGGTGCTATCCTTAACTTGAAGAAA
 GGTCCCTGCTATGGATGTTGCTCAGGCTAACCTTAAC TTCACAACGATTATCATTACCCAGCT
 ACTGGTAAGCCTAACCAGATGTGGTTGCCAGTTTTTTAT

Mistellektin B4 (angepaßt)

D D V T C S A S E P T V R I V G R N G M R
V D V R D D D F H D G N Q I Q L W P S K S
N N D P N Q L W T I K R D G T I R S N G S
C L T T Y G Y T A G V Y V M I F D C N T A
V R E A T I W Q I W D N G T I I N P R S N
L V L A A S S G I K G T T L T V Q T L D Y
T L G Q G W L A G N D T A P R E V T I Y G
F R D L C M E S N G G S V W V E T C D S S
Q K N Q G K W A L Y G D G S I R P K Q N Q
D Q C L T S G R D S V S T V I N I V S C S
G A S G S Q R W V F T N E G A I L N L K K
G P A M D V A Q A N P K L R R I I I Y P A
T G K P N Q M W L P V F

Mistellektin B5 (angepaßt)

GACGATGTGACATGTTCTGCATCTGAACCAACTGTTAGGATCGTTGGAAGAAACGGTATGCGT
GTTGATGTTTCGGGACGATGACTTTCATGACGGTAACCAAATCCAACCTTTGGCCTAGTAAGTCT
AATAACGACCCAAACCAACTTTGGACTATTAAGAGAGACGGTACAATCAGGTCTAACGGATCT
TGTCTTACTACATACGGTTACACTGCAGGAGTTTACGTTATGATTTTTGATTGCAACACAGCA
GTTAGAGAAGCTACAATCTGGCAAATCTGGGATAACGGAACCTATTATTAACCCTCGTTCTAAC
TTGGTGCTTGCTGCTTCTAGTGGTATTAAGGGAACAACCTTTGACTGTTTCAGACTTTGGACTAT
ACTCTTGGTCAAGGATGGTTGGCTGGAAACGACACAGCTCCTAGAGAAGTTACAATCTACGGA
TTTAGAGATTTGTGTATGGAGTCTAACGGTGGATCTGTTTGGGTGAAACTTGTGATTCATCT
CAGAAAAATCAGGGCAAGTGGGCACTTTATGGTGACGGAAGTATCAGACCTAAGCAGAATCAG
GATCAGTGTTTGACATCCGGTAGGGATAGTGTGTCTACTGTTATTAACATTGTGTCTTGTTCT
GGAGCTAGTGGATCTCAAAGGTGGGTTTTACAAACGAGGGTGCTATCCTTAACCTGAAGAAC
TCTCTTATGGTGGATGTTGCTCAGGCTAACCTAAGTTGAGAAGGATTATCATTTACCCAGCT
ACTGGTAAGCCTAACCAGATGTGGTTGCCAGTTTTTTAT

Mistellektin B5 (angepaßt)

D D V T C S A S E P T V R I V G R N G M R
V D V R D D D F H D G N Q I Q L W P S K S
N N D P N Q L W T I K R D G T I R S N G S
C L T T Y G Y T A G V Y V M I F D C N T A
V R E A T I W Q I W D N G T I I N P R S N
L V L A A S S G I K G T T L T V Q T L D Y
T L G Q G W L A G N D T A P R E V T I Y G
F R D L C M E S N G G S V W V E T C D S S
Q K N Q G K W A L Y G D G S I R P K Q N Q
D Q C L T S G R D S V S T V I N I V S C S
G A S G S Q R W V F T N E G A I L N L K N
S L M V D V A Q A N P K L R R I I I Y P A
T G K P N Q M W L P V F